

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Robert Grosse  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Marburg

## **Neue Gentargeting-Strategien auf Basis der RNA interference (RNAi)**



Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Stephanie Werth  
aus Frankenberg/Eder

Marburg, 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
25.07.2013

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. A. Aigner

Korreferent: Prof. Dr. B. Schmeck

*Für meine Eltern*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Tumorwachstum und Tumorangiogenese	2
1.2 Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor: VEGF	4
1.3 Der Heparin-bindende Wachstumsfaktor Pleiotrophin: PTN	7
1.4 RNA Interferenz	9
1.4.1 Mechanismus der RNA Interferenz	10
1.5 Polyethylenimine	11
<b>2 Aufgabenstellung und Zielsetzung</b>	<b>17</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>18</b>
3.1 Material	18
3.1.1 Geräte und Zubehör	18
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	19
3.1.3 Zelllinien und Zellkulturmedien	20
3.1.4 Chemikalien und Puffer	20
3.1.5 Kits, Enzyme und Marker	21
3.1.6 Oligonukleotide und Plasmide	22
3.1.7 Antikörper	22
3.2 Methoden	23
3.2.1 Gel-Permeationschromatographie zur PEI-Fraktionierung	23
3.2.2 PEI-Quantifizierung (Konzentrationsbestimmung)	23
3.2.3 Zellkultur und steriles Arbeiten	25
3.2.4 Transfektionen	27
3.2.4.1 pH-Wert-Einstellung des Puffers/ der Lösung	28
3.2.4.2 Komplexierung	28
3.2.4.3 Transiente Transfektionen	29
3.2.4.4 Co-Transfektionen	29
3.2.4.5 Transfektion für PTN-ELISA	30
3.2.5 Lyophilisierung	30
3.2.6 Luciferase-Aktivitätsmessung in Zelllysaten	31
3.2.7 Transformation und Vermehrung von Bakterien, Präparation der Plasmid-DNA (Midi-Präparation)	33
3.2.7.1 Transformation kompetenter Bakterienzellen mit dem	33

Vektor pGI3-NFκB	
3.2.7.2 Bakterienzellen- Freeze down (pGI3-NFκB)	34
3.2.7.3 Präparation der Plasmid-DNA (Midi-Präparation)	34
3.2.8 Quantifizierung von Nukleinsäuren: DNA- bzw. RNA-Konzentrations-Bestimmung	35
3.2.9 RNA-Präparation	36
3.2.9.1 Homogenisieren der Zellsuspension	36
3.2.9.2 Phasentrennung	37
3.2.9.3 Präzipitation der RNA	37
3.2.9.4 Waschen der RNA	37
3.2.9.5 Lösen der RNA	37
3.2.10 Northern-Blot	38
3.2.11 PTN-ELISA	42
3.2.12 Proliferations-Assay (WST-Assay)	44
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>45</b>
4.1 Herstellung des niedermolekularen F25-LMW-PEI	45
4.1.1 Gel-Permeationschromatographie	45
4.1.2 Konzentrationsbestimmung durch Verwendung einer Standardreihe und Erstellung einer PEI-Eichgeraden	45
4.1.3 Erstellung eines PEI-Elutionsprofils	46
4.1.4 Charakterisierung einzelner Fraktionen und Vereinigung zu F25-LMW-PEI	47
4.2 Optimierung der DNA-Transfektionseffizienz von F25-LMW-PEI	48
4.3 Transiente Co-Transfektionen von DNA und siRNA	50
4.3.1 Direkter Vergleich der Komplexierungsbedingungen in 150 mM NaCl oder dem Puffer NaCl-HEPES	53
4.4 DNA-Transfektionseffizienz und Effizienz des siRNA-Knockdowns nach Lyophilisierung	54
4.5 Vergleich der Transfektionsbedingungen bei stabil Luciferase-exprimierenden SKOV3-10-Zellen	57
4.6 Vergleich der Transfektionsbedingungen bei stabil Luciferase-exprimierenden SKOV3-10-Zellen nach Lyophilisierung	59
4.7 Vergleich des PEI/siRNA-vermittelten Knockdowns in	62

	Abhängigkeit von Ratio, Lösung und Puffer	
4.8	Vergleich des PEI/siRNA-vermittelten Knockdowns in Abhängigkeit vom Puffer nach Lyophilisierung	65
4.9	Vergleich des PEI/siRNA-vermittelten Knockdowns nach Lyophilisierung der Komplexe in Platten versus in Eppendorfgefäßen	68
4.10	Vergleich des siRNA-vermittelten Gentargetings bei Transfektionen in FCS-freiem und 2% FCS-haltigem Medium	70
4.11	Darstellung des siRNA-vermittelten Knockdowns ohne Verwendung von DNA	73
4.12	Darstellung des siRNA-vermittelten Knockdowns nach Lyophilisierung der Komplexe ohne Verwendung von DNA	75
4.13	Vergleich der Transfektionseffizienzen nach Lagerung der entweder lyophilisierten oder in Lösung befindlichen Komplexe für 1 oder 10 d bei 4°C	76
4.14	Verminderte PC3-Zellproliferation durch PEI/siRNA- vermitteltes VEGF-Targeting	79
4.15	Proliferationsassay mit U87-Zellen	82
4.16	Northern-Blot: PTN-Herunterregulation	85
4.17	PTN-ELISA	86
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>104</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>106</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>120</b>
<b>10</b>	<b>Verzeichnis akademischer Lehrer</b>	<b>121</b>

## 1 Einleitung

In der Todesursachenstatistik stehen Krebserkrankungen bisher nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Deutschland an zweiter Stelle. Jährlich erkranken ca. 450.000 Menschen neu an einer malignen Tumorerkrankung, 216.000 Menschen sterben daran. Aufgrund der demographischen Entwicklung der Bevölkerung geht man davon aus, dass die Anzahl an Neuerkrankungen bis 2050 um 30% zunehmen wird. Mit rund 64.370 Neuerkrankungen im Jahr ist das Prostatakarzinom in Deutschland heute die häufigste Krebsart beim Mann [Schröder et al. (2009)], gefolgt vom kolorektalen Karzinom mit einer Inzidenz von 39.410. Bronchialkarzinome belegen bei den Männern mit 35.150 Erkrankungen pro Jahr Platz drei, sind aber mit der höchsten Letalität verbunden.

Häufigste Krebsart bei der Frau ist das Mammakarzinom, an dem jährlich 59.510 Frauen in Deutschland neu erkranken. 40% der betroffenen Frauen sind jünger als 60 Jahre. An zweiter Stelle steht bei den Frauen das kolorektale Karzinom mit 33.620 Neuerkrankungen pro Jahr, bei steigender Anzahl der Raucherinnen steht das Bronchialkarzinom mit einer Inzidenz von 15.180 auf Platz drei.

Bei Kindern ist Krebs die zweithäufigste Todesursache. In Deutschland erkranken jährlich rund 1.750 Kinder unter 15 Jahren an einer malignen Erkrankung. Die häufigsten Krebsarten sind Leukämien, ZNS-Tumore und Lymphome [RKI (2010)].

Die frühzeitige Erkennung und damit die Vorsorge von Krebserkrankungen spielt eine entscheidende Rolle für die Heilungschancen und die Überlebensrate der Patienten.

Bei Vorliegen einer Krebserkrankung stehen nun neben den bewährten Methoden der operativen Therapie, der Radiatio und der (Poly-) Chemotherapie neue Wirkstrategien wie die Gentherapie, die Immunmodulation oder die Antikörpertherapie zur Verfügung.

## 1.1 Tumorwachstum und Tumorangiogenese

Das Wachstum und die Progression maligner Tumore sowie deren Metastasierung wird durch die Tumorangiogenese, d. h. das Aussprossen von Kapillaren aus lokalen Blutgefäßen in den Tumor und das umliegende Gewebe, mitbestimmt. Angiogenese findet man aber nicht nur bei Tumorwachstum oder Metastasierung, sondern auch physiologisch in der Wundheilung, beim zyklischen Aufbau der Endometriumschleimhaut sowie bei Reproduktion und Organwachstum in der Embryologie [Nyberg et al. (2005)]. Die gefäßwandbildenden Endothelzellen der Blutgefäße teilen sich im Gegensatz zu anderen Körperzellen wie z.B. Darmepithelzellen sehr selten (nur 0,1% der Endothelien sind teilungsaktiv), da sie unter strenger Kontrolle von endogenen Angiogenesestimulatoren sowie -inhibitoren stehen. Hier herrscht ein angiogenes Gleichgewicht, bei dem Stimulatoren und Inhibitoren der Angiogenese ausgeglichen sind und keine Proliferation von Endothelzellen stattfindet [Folkman (1995)]. Über 30 körpereigene Stimulatoren der Angiogenese wurden bislang identifiziert, hierunter zählen z. B. Fibroblast growth factors (FGF's), Vascular endothelial growth factors (VEGF-A, B, C, D), Angiopoietine (Ang-1, Ang-2), Pleiotrophin, Platelet derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF/TP), Platelet derived growth factor (PDGF), Epidermal growth factor (EGF), Interleukin-8 und Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) [zur Übersicht Ribatti et al. (2008)].

Körpereigene Inhibitoren der Angiogenese sind häufig Bestandteile der natürlichen extrazellulären Matrix (ECM) oder von Membranproteinen. Beispiele hierfür sind Thrombospondin 1 und 2, Kollagenfragmente, Endostatin, Canstatin und Arresten. Membranunabhängige Inhibitoren sind Wachstumsfaktoren und Zytokine wie Interferon  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , Interferon gamma inducible protein 10 (IP-10), Interleukine 1, 4 und 12, Platelet factor 4 und andere Faktoren wie Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP's), Urokinase receptor antagonists, Endostatin, Angiostatin und Troponin I [Nyberg et al. (2005)].

Durch die Entartung einer Körperzelle entsteht ein maligner Zellklon, der zunächst angiogeneseunabhängig heranwächst. In dieser avaskulären Phase werden die Tumorzellen mittels Diffusion mit Sauerstoff und Nährstoffen



versorgt. Bei weiterem Heranwachsen des Tumors kann dann die entstehende Diffusionstrecke (das Diffusionslimit für Sauerstoff liegt bei 100  $\mu\text{m}$ ) nicht mehr überwunden werden. Ein folgendes Wachstum des Tumors ist nun nur noch durch Aktivierung der Tumorangiogenese und der damit verbundenen Blutversorgung des Tumors möglich [Folkman et al. (1995)]. Durch die initialisierte Kapillarisation wird die Versorgung der proliferierenden Zellen mit Sauerstoff, Nährstoffen, Tumorstromafaktoren, Hormonen und proteolytischen Enzymen sowie Koagulation- und Fibrinolyse-kontrollierenden Enzymen gewährleistet.

Maligne Zellklone, welche zu klinisch relevanten Tumorerkrankungen heranwachsen, durchlaufen an dieser Stelle den angiogenen Switch [Hanahan et al. (1996)] mit Stimulation der Angiogenese. Hieraus resultiert die Verschiebung des angiogenen Gleichgewichtes und es kommt zu Endothelzellproliferation und zum Gefäßwachstum. Die Verschiebung des angiogenen Gleichgewichtes wird entweder durch die gesteigerte Sekretion oder Freisetzung von Angiogenesestimulatoren oder durch die Herunterregulation der Angiogeneseinhibitoren erreicht. Es kommt zur Einleitung der angiogenen Kaskade mit Auflösung der extrazellulären Matrix und der vaskulären Basalmembran durch die Einwirkung von Proteasen wie z. B. Metalloproteinasen. Ist die Basalmembran eröffnet, wandern die Endothelzellen aus ihrem Verbund und orientieren sich in Richtung des angiogenen Stimulus. Gleichzeitig proliferieren die Endothelzellen und bilden durch kreisförmige Verformung gefäßähnliche Strukturen.

In den frühen Stadien der Angiogenese, nach Stimulation von Endothelzellen durch vascular endothelial growth factor (VEGF), weist die Gefäßwand etliche Lecks auf, so dass hochmolekulare Proteine aus den Gefäßen in den interstitiellen Raum austreten können. Dies führt zur Abscheidung einer provisorischen Matrix und Erhöhung des interstitiellen Drucks sowie zur Induktion der interstitiellen Konvektion [Vandoorne et al. (2010)]. Es entstehen so neue Gefäßstrukturen, die die Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen sicherstellen. Diese Tumorgefäße sind jedoch in ihrer Struktur undicht und hyperpermeabel [Dvorak et al. (1995)], ermöglichen aber die

Aussaat der metastatisch-kompetenten Tumorzellen und die Metastasierung in zunächst unberührte Organe [Rak et al. (1995)].

In dieser vaskulären Phase der Tumorprogression proliferieren die Tumorzellen exponentiell [Hanahan et al (1996)] und durch die lokale Angiogenese kommt es im Tumor, zumindest fokal, zur erhöhten Dichte von Blutgefäßen, verglichen mit dem Normalgewebe.

Die Ausprägung der Gefäßdichte (vascular density) konnte in unterschiedlichen Tumorentitäten mit der Prognose der Erkrankung korreliert werden. Auch erhöhte Werte für Angiogenesestimulatoren wie VEGF zeigten bei vielen Tumoren eine gute Korrelation mit der Prognose der Erkrankung. Eine hohe Gefäßdichte sowie eine erhöhte Expression von Angiogenesestimulatoren gehen mit einer schlechteren Prognose einher [Folkman (1995)].

## **1.2 Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor: VEGF**

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF ist ein spezifisches Mitogen und Stimulator für das Wachstum vaskulärer Endothelien, besitzt aber auch Effekte auf andere Zellen wie z.B. bei der Monozyten- und Makrophagenmigration [Senger (2010)]. 1989 wurde VEGF erstmals kloniert und sequenziert und es wurde schnell erkannt, dass VEGF alle Merkmale eines wichtigen Angiogenese-Faktors einschließlich einer ähnlichen Sequenzhomologie zum platelet-derived growth factor PDGF aufweist [Leung et al. (1989)]. VEGFs sind, wie unter 1.1 beschrieben, wichtige Faktoren in der embryonalen und physiologischen Entwicklung. Bei pathologischen Prozessen wie Wundheilungsstörung, rheumatoider Arthritis, altersbedingter Makuladegeneration, Endometriose und kardiovaskulären Erkrankungen (pathologische Vaskularisierung [O'Brien et al. (1994)] und atherosklerotische Plaques [Feghhi et al. (2011)]) spielen sie eine wichtige Rolle [zur Übersicht: Kajdaniuk et al. (2011)].

Die VEGF-Familie besteht aus den Faktoren VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F und dem plazentaren Wachstumsfaktor PlGF.

VEGF-E konnte in Viren nachgewiesen werden, VEGF-F wurde aus Schlangengift extrahiert [Yamazaki et al. (2003)]. Die einzelnen VEGF-Familienmitglieder haben zwar die gleiche Grundstruktur, unterscheiden sich aber grundlegend in ihrer physikalischen und biologischen Aktivität durch Bindung an drei unterschiedliche Tyrosinkinase-Rezeptoren sowie an die Rezeptoren Neuropilin-1 (Nrp-1) und Neuropilin-2 (Nrp-2). Das VEGF/VEGF-Rezeptor-System ist eine Schlüsselkomponente in dem sehr komplexen Prozess der Angiogenese [Roy et al. (2006)].

Das VEGF-A ist Hauptstimulator der Angiogenese und wurde in verschiedenen Studien hinsichtlich der Angiogenese vieler physiologischer, aber auch pathologischer Mechanismen wie Tumorwachstum, Endometriose, rheumatoider Arthritis und kardiovaskulären Erkrankungen untersucht. Das menschliche VEGF-A ist lokalisiert auf dem Chromosom 6p21.3 und enthält 8 Exons, welche durch 7 Introns separiert werden. VEGF-A-Effekte werden hauptsächlich durch Bindungen an die Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 sowie an Nrp-1 und Nrp-2 reguliert.

Eine VEGF-A-Überexpression durch Karzinomzellen im Falle eines angiogenen Switches führt über die Rezeptorstimulation zu einer vermehrten Blutgefäßbildung [Ferrara et al. (2003)], welche zu große, dilatierte und poröse Gefäße zur Folge hat. Es wird vermutet, dass VEGF-A eine Gefäßpermeabilität durch Bindung an den VEGFR-2 sowie Aktivierung einer Guanylatcyclase und cGMP mittels NO abhängigem „Pathway“ hervorruft [Roy et al. (2006)]. Erhöhte cGMP-Spiegel führen zu einer verstärkten endothelialen Permeabilität, zu Fenestrationsen und transzellulären Lücken. Hierdurch kommt es weiterhin zur Extravasation von Plasma und Plasmaproteinen wie Fibrin, welches eine verstärkte Migration von Endothelzellen in die extrazelluläre Matrix bewirkt [Bootle-Wilbraham et al. (2001)]. VEGF-A bewirkt zusätzlich eine vermehrte Vasodilatation durch Induktion der endothelialen Nitritoxid Synthase (eNOS) und vermehrter NO-Produktion.

Zurzeit sind 6 verschiedene Isoformen von VEGF-A mit verschiedenen Polypeptidlängen bekannt: VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>145</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>183</sub>, VEGF-A<sub>189</sub> und VEGF-A<sub>206</sub>. Diese Isoformen besitzen unterschiedliche, aber

überlappende biologische Aktivitäten und binden in unterschiedlicher Weise an die Heparansulfat-Domänen der VEGF-Rezeptoren und an die Neuropiline.

Die meisten VEGF-produzierenden Zellen exprimieren VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>183</sub> und VEGF-A<sub>189</sub>. Im menschlichen Organismus werden zumeist VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>183</sub> und VEGF-A<sub>189</sub> hergestellt, VEGF-A<sub>145</sub> und VEGF-A<sub>206</sub> scheinen nur in pflanzlichen Zellen vorzukommen.

VEGF-A<sub>165</sub> und VEGF-A<sub>189</sub> sind heparinbindend, VEGF-A<sub>145</sub> bindet an die extrazelluläre Matrix, VEGF-A<sub>121</sub> besitzt keine Heparinbindefähigkeit. VEGF-A<sub>189</sub> und VEGF-A<sub>206</sub> haben eine stärkere Affinität zu Zelloberflächen-Proteoglycanen und Heparin, sie sind in die extrazelluläre Matrix und die Zelloberfläche integriert, weshalb sie in vivo weniger aktiv sind als die beiden sekretorischen Isoformen VEGF-A<sub>121</sub> und VEGF-A<sub>165</sub> [zur Übersicht: Ferrara et al. (2003)].

Die VEGF-A-mRNA-Expression wird über Aktivierung des hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) durch Hypoxie induziert. Auch die Ausschüttung anderer Wachstumsfaktoren, inflammatorischer Zytokine und Hormone führen zu einer Hochregulierung der VEGF-A-mRNA-Expression [Ferrara (2004)].

Aufgrund dieser in vitro und in vivo nachgewiesenen Eigenschaften spielt VEGF eine wichtige Rolle während normaler und pathologischer Angiogenese und ist dadurch in den Focus moderner Krebsforschung gerückt [Brekken et al. (1998)]. Therapeutische Ansätze sind z.B. die Therapie mit dem VEGF-Antikörper Bevacizumab (z.B. Avastin®). Bevacizumab wurde 2007 in Folge der vorgelegten Daten der Phase-III-Zulassungsstudie E2100 in Kombination mit Paclitaxel für die First-Line-Therapie des HER2-negativen, metastasierten Mammakarzinoms zugelassen [zur Übersicht: Goldfarb et al. (2011), Gray et al. (2009)]. Auf der Basis der Ribbon-1-Studie erfolgte 2011 die Erweiterung der Zulassung in Kombination mit dem oralen Fluoropyrimidin Capecitabin bei Patientinnen, die für eine Behandlung mit anderen Chemotherapien, inklusive Taxanen und Anthrazyklinen, nicht geeignet sind [Robert et al. (2011)].

In Kombination mit einer Chemotherapie auf Fluoropyrimidin-Basis wird Bevacizumab zur Behandlung von Patienten mit metastasiertem Kolon- oder Rektumkarzinom angewendet [zur Übersicht: Tol et al. (2010)]. Bei Patienten

mit inoperablem fortgeschrittenem oder rezidivierendem nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom wird der VEGF-Antikörper zusammen mit einem platinhaltigem Chemotherapeutikum angewendet [Lima et al. (2011)]. Interferon alfa-2a und Bevacizumab werden gemeinsam bei fortgeschrittenem und/oder metastasiertem Nierenzellkarzinom angewendet [Escudier et al. (2007)].

Die Frage nach den zu erwartenden Nebenwirkungen durch die VEGF-Antikörpertherapie lässt sich aufgrund der vorliegenden präklinischen Daten noch nicht abschließend beantworten.

### **1.3 Der Heparin-bindende Wachstumsfaktor Pleiotrophin: PTN**

Pleiotrophin (PTN) ist ein sekretierter Heparin-bindender Wachstumsfaktor mit einer Molmasse von ca. 18 kDa, welcher auch „heparin-binding growth-associated molecule“ (HB-GAM), „heparin affinity regulatory peptide“ (HARP), „heparinbinding neurite-promoting factor“ (HBNF) oder „osteoblast specific factor-1“ (OSF-1) genannt wird [zur Übersicht: Grzelinski et al. (2005)]. Zu den verschiedenen Namen kam es, weil Pleiotrophin nicht nur im Gehirn von Ratten [Rauvala et al. (1987)], sondern auch in vielen anderen Geweben als Stimulus für Entwicklungsvorgänge gefunden und mehrfach neu benannt wurde. Humanes, Maus- und Ratten-PTN sind in ihrer Struktur identisch.

PTN bildet zusammen mit Midkine, mit dem es in seiner Sequenz zu 50% übereinstimmt [Schulte et al. (1997)] eine neue Familie Heparin-bindender Wachstumsfaktoren, die nicht verwandt sind mit anderen Familien Heparin-bindender Wachstumsfaktoren wie z.B. Fibroblasten Wachstumsfaktoren [Zhang et al. (1999)].

Während der Embryonalentwicklung spielt PTN eine wichtige Rolle und ist ebenso bei der Entwicklung und Ausbildung von Neuronen, Axonen und bei der Synapsenbildung beteiligt [Li et al. (1990)]. Ebenfalls ist PTN ein wichtiges Protein für Tumorwachstum und Angiogenese [Mikelis et al. (2011)]. Es bewirkt eine Proliferation von Fibroblasten sowie von Endothel- und Epithelzellen [Fang et al. (1992)]. Während der pränatalen Knochenentwicklung ist PTN in sehr hohen Konzentrationen nachweisbar und für die enchondrale Knochenbildung

verantwortlich [Imai et al. (1998)]. Bei der fibrinolytischen Stimulation von Endothelzellen ist es ebenfalls beteiligt [Kojima et al. (1995)].

Ein erhöhtes Vorkommen von PTN findet man bei bösartigen Erkrankungen, wie bei Gliomen, Melanomen [Czubayko et al. (1996)], Meningiomen, Neuroblastomen, Chorionkarzinomen, bei Leukämien sowie bei Karzinomen des Pankreas [Weber et al. (2000)], des Magens, des Kolons [Kong et al. (2012)], der Prostata, der Brust [Chang et al. (2007)], der Ovarien und der Lunge [Feng et al. (2010)]. Die protoonkogene Wirkung des PTN-Gens beruht hauptsächlich auf der Stimulation der Proliferation von Tumorzellen und der Angiogenese und ist mit einer vermehrten Expression des PTN verbunden [Deuel et al. (2002)]. Eine erhöhte Pleiotrophinexpression korreliert im Fall von Neuroblastomen mit einer eher günstigeren Prognose [Nakagawara et al. (1995)]. Ebenfalls erhöhte PTN-Serumwerte konnten bei Patienten mit seminomem und nicht-seminomem Hodenkrebs nachgewiesen werden [Aigner et al. (2003)] sowie bei Patienten mit Pankreaskarzinomen [Souttou et al. (1998)]. Bei Pankreaskarzinomen war die Prognose jedoch mit ansteigenden PTN-Werten verschlechtert und es konnte ein Abfall des PTN im Serum nach erfolgreicher Resektion der Pankreaskarzinome nachgewiesen werden, so dass PTN als Marker und prognostischer Indikator eine Rolle beim Pankreaskarzinom spielen könnte [Klomp et al. (2002)].

Die biologischen Aktivitäten von Pleiotrophin werden durch drei verschiedene Rezeptoren vermittelt: SDC3 (N-Syndecan) [Raulo et al. (1994)], Receptor Proteine Tyrosine Phosphatase (RPTP $\beta/\zeta$ ) [Maeda et al. (1996)] und Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) [Stoica et al. (2001)]. N-Syndecan und RPTP $\beta/\zeta$  wurden beim Neuritenwachstum nachgewiesen [Diamantopoulou et al. (2010)]. PTN bindet an den ALK-Rezeptor und aktiviert dessen Tyrosinkinase-Aktivität [Lu et al. (2005)].

PTN inaktiviert den Transmembran-Rezeptor RPTP $\beta/\zeta$ . Durch die Interaktion von PTN und RPTP $\beta/\zeta$  kommt es zu einer erhöhten Steady-state Tyrosinphosphorylierung von beta-Catenin [Deuel et al. (2002)] und einer erhöhten Tyrosinphosphorylierung des PTN / RPTP $\beta/\zeta$ -Signalwegs [Perez-Pinera et al. (2007)].

Die Daten von Zhang et al. deuten die Möglichkeit an, dass Mutationen, die das Gen PTN aktivieren, in präkanzerösen Zellen ausreichen, um einen angiogenen Switch in vivo zu stimulieren. Über den angiogenen Switch mit einer vermehrten Bildung von Blutgefäßen durch Endothelproliferation könnte die PTN-Aktivierung einen wichtigen Schritt zur Entwicklung menschlicher Tumore beitragen. Hier wurde ebenfalls gezeigt, dass die C-terminale und N-terminale Domäne von PTN gleichermaßen einen Switch von präkanzerösen Zellen zu Zellen mit aggressiverem Tumorwachstum bedingen, es unterscheiden sich jedoch der Mechanismus und die Signalkaskade [Zhang et al. (2006)].

#### **1.4 RNA Interferenz**

Das Prinzip der RNA Interferenz (RNAi) und dem durch doppelsträngige dsRNA herbeigeführten Gen-Knockdown wurde zuerst in *Caenorhabditis elegans*, einem Nematoden-Wurm, von Andrew Fire et al. 1998 beobachtet, nachdem den Nematoden doppelsträngige RNA injiziert wurde [Fire et al. (1998)]. Für die Entdeckung der RNA Interferenz erhielten Andrew Fire und Craig Mello 2006 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

Unter RNAi versteht man einen natürlichen Mechanismus in eukaryotischen Zellen [Dillin (2003)], der die Expression von einzelnen Genen reguliert und bei dem doppelsträngige siRNA als regulierendes Molekül beteiligt ist [Demeneix et al. (2004)]. Elbashir et al. zeigten, dass die siRNA-Stränge in der Lage sind, ihre Ziel-mRNA zu zerstören [Elbashir et al. (2001)].

Die RNAi kann sowohl auf Chromatin-Ebene, post-transkriptionell als auch translationell eintreten. Diese Methode führt zur Spaltung oder zur Translationsblockade der Ziel-mRNA und zum Methylieren und Abschalten des entsprechenden Gens.

Somit wird die Produktion bestimmter Proteine gestoppt, dies spielt z.B. bei der Abwehr von Viren eine große Rolle, aber auch bei der Herunterregulation von Tumorsuppressorgenen, Tumorrezeptoren oder Angiogenesefaktoren.

### 1.4.1 Mechanismus der RNA Interferenz

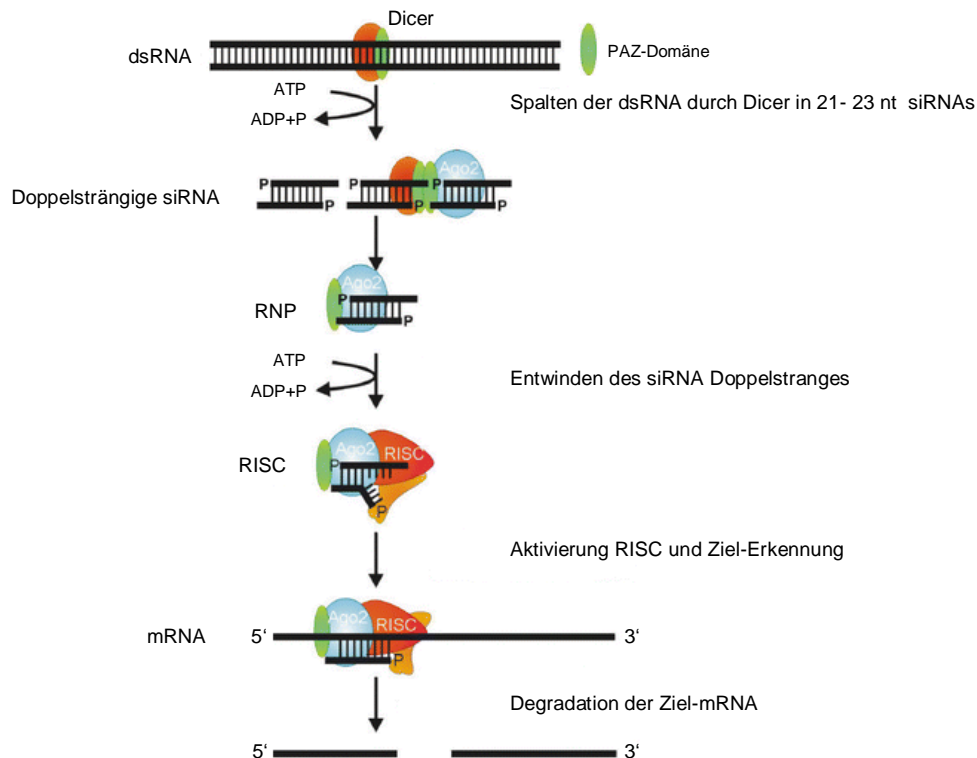
Bei der RNA Interferenz werden doppelsträngige dsRNA-Stränge von dem Enzym Dicer in einem ATP-abhängigen Vorgang in 21 bis 23 Nukleotide lange siRNA-Moleküle (short interfering RNA) gespalten [Bernstein et al. (2001), Zamore et al. (2000)].

Dicer ist ein RNase-III-ähnliches Enzym, welches sich aus zwei RNase-III-Domänen und einer PAZ-Domäne zusammensetzt. Der Abstand zwischen den beiden Domänen wird durch einen Helixbereich bestimmt, dessen Länge die Länge der entstehenden doppelsträngigen siRNAs bestimmt. Jede RNase-Domäne enthält ein aktives Zentrum, in dem die Spaltung eines Stranges der dsRNA stattfindet. Die dsRNA-Moleküle werden unabhängig von ihrer Sequenz durch Hydrolyse 22 Nukleotide oberhalb des 3'-Endes gespalten, wobei die PAZ-Domäne (der Name leitet sich aus den drei Proteinen ab, in welchen die Domäne zuerst gefunden wurde: Piwi, Argonaut und Zwiile/Pinhead) dabei eine Bindungsstelle für das 3'-Ende der dsRNA aufweist und diese dabei verankert. Im Anschluss werden die Dicer-siRNA Komplexe durch das zelluläre Protein TRBP (transactivating response RNA-binding protein) zum RISC (RNA-induced silencing complex) transferiert und dort wird die dsRNA mit der schwächeren Bindungsenergie des 5'-Endes in den RISC-Komplex inkorporiert [Martinez et al. (2002), Hammond et al. (2000)] und durch ATP aktiviert.

Der siRNA-Doppelstrang (dsRNA) wird durch eine RNA-Helikase-Domäne entwunden [Nykänen et al. (2001)] und der dann freiliegende siRNA-Antisense-Strang leitet den RISC-Komplex zur Ziel-mRNA, wo über Watson-Crick-Basenpaarung die Bindung an die Ziel-mRNA erfolgt. Nach Bindung des Antisense-Stranges kommt es zur Spaltung der Ziel-mRNA durch die katalytische Untereinheit Argonaute 2 (Ago 2) von RISC. Hierbei spielt die Piwi-Domäne von Ago 2 eine wichtige Rolle [Carmell et al. (2002)], da diese eine RNase H-like Endonuklease Aktivität besitzt, welche eine einzelne Phosphodiesterbindung im Rückgrad der Ziel-mRNA spalten kann [Kim et al. (2007)].

Je nach Grad der Komplementarität der siRNA und der Ziel-mRNA kommt es zur endonukleolytischen Degradation der Ziel-mRNA oder zur Repression der Translation der Ziel-mRNA [Bartel (2004)].





**Abbildung 1.1 Mechanismen der RNA-Interferenz [Arenz et al. (2003)]**

SiRNAs degradieren sehr schnell und weisen eine große Instabilität auf. Einen Ausweg aus dieser Situation bieten z.B. Polymere und Liposomen, die durch Aufnahme von Nukleinsäuren zur Bildung von Poly- und Lipoplexen führen. Sie können DNA- oder RNA-Moleküle einschließen bzw. kondensieren und bieten einen Schutz vor Degradation durch Nukleasen. Ein für Transfektionen gut geeignetes Polymer ist Polyethylenimin [Kircheis et al. (2001)].

## 1.5 Polyethylenimine

Zur Einschleusung von Nukleinsäuren in den Zellkern unterscheidet man virale und nicht-virale Methoden. Virale Systeme zeichnen sich insbesondere durch ihre hohe Effizienz aus [Seisenberger et al. (2001)]. Man bezeichnet diesen Vorgang, bei dem fremdes Genmaterial mittels viraler Systeme in Zellen eingebracht wird, als Transduktion. Als aktuelle Gentransfer-Vektoren werden Adenoviren, Herpesviren, Lentiviren, Adeno-assoziierte Viren und Retroviren eingesetzt. Mit Hilfe der viralen Gentransfer-Vektoren werden hohe

Transfektionseffizienzen erreicht, aber gerade im in vivo Bereich bergen sie eine enorme Gefahr aufgrund ihrer ausgelösten Immunantwort und der onkogenen Eigenschaften [Check (2002), Lungwitz et al. (2005)].

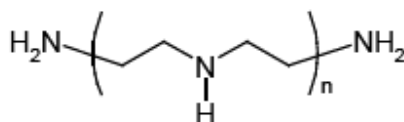
Bei den nicht-viralen Methoden zur Einschleusung von DNA in den Zellkern wurden verschiedene Gentransfersysteme verwendet, die aktuell im Blickpunkt der Forschung liegen. Unkomplexierte, d.h. „nackte“ DNA wird durch Anwendung von Elektroporation, der „Gene Gun“ oder durch Ultraschallverfahren in den Zellkern eingebracht. Bei der Verwendung der „Gene Gun“ werden Gold- oder Wolfram-DNA-Plasmid Komplexe mit Gasdruck in den Zellkern geschossen, wodurch die Gold- bzw. Wolframpartikel die Zellmembran penetrieren und die DNA auf ihrem Weg aus diesem Komplex freigesetzt wird. Bei der Elektroporation [Rols (2008)] und bei der Verwendung von Ultraschall entstehen Poren in der Zellmembran, durch welche die DNA diffundieren und somit in das Zytoplasma der Zellen eindringen kann. Ein Problem der Verwendung von „nackter“ DNA ist die Instabilität und der Abbau der DNA im Cytosol durch Nukleasen und somit eine verminderte Transfektionseffizienz.

Der Einschluss der DNA kann auch durch neutrale oder anionische Lipide [Edelstein et al. (2007)] erfolgen. Eine ebenfalls nicht-virale Technik des Gentransfers ist die Komplexierung von DNA mit kationischen Molekülen, darunter Polymere und Lipide. Die Gentransferkomplexe, welche aus kationischen Polymeren und Plasmid-DNA bestehen, werden Polyplexe genannt. Als Polyfektion wird in diesem Verfahren der Gentransfer in die Zelle bezeichnet. Durch Variation der Kettenlänge bzw. des Verzweigungsgrades des Polymers und des molaren Verhältnisses zur Plasmid-DNA kann die Nettoladung, Bindungsstärke und Größe der Komplexe gesteuert werden.

Boussif et al. beschrieb 1995 erstmals die Transfektionseffizienz von Polyethylenimin (PEI) und den Einsatz beim nicht-viralen Gentransfer in vivo und in vitro, wobei PEI-Moleküle von 800 kDa und 25 kDa sowie verschiedene Zelllinien und primäre Zellkulturen eingesetzt wurden [Boussif et al. (1995)]. Polyethylenimine sind lineare [Bologna et al. (2003)] oder verzweigte Polymere [Lemkine et al. (2001)], die durch Anwendung unterschiedlicher Syntheseverfahren in verschiedenen molekularen Größen, von < 1.000 Da (low

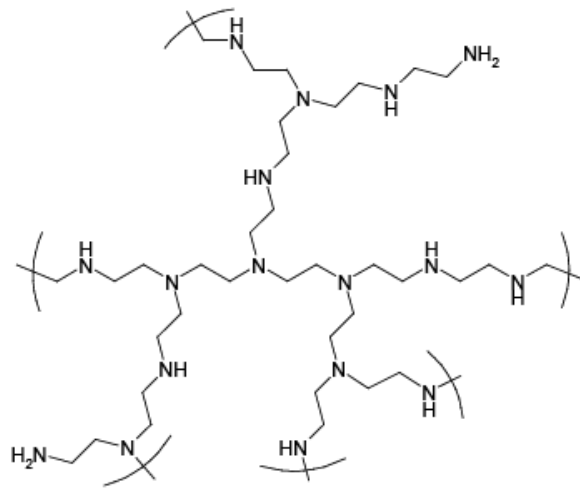
molecular weight PEIs) bis > 1.000 kDa (high molecular weight PEIs), vorliegen [Godbey et al. (2001)].

Aufgrund von sekundären Amin-Gruppen bei linearen PEI-Molekülen und sekundären sowie tertiären Amin-Gruppen bei verzweigten PEI-Molekülen liegt eine hohe Pufferkapazität über eine breite pH-Spanne vor [Tang and Szoka (1997)]. Im physiologischen pH-Bereich ist jedes fünfte bis sechste Stickstoffatom protoniert. Durch Bindung von Nukleinsäuren über elektrostatische Kräfte [Bloomfield (1996)] wird dieses Profil geändert und bei physiologischem pH-Wert ist dann jedes zweite bis dritte Stickstoffatom protoniert [Kircheis et al. (2001)]. Diese Eigenschaft bedingt die hervorragende Pufferkapazität des PEIs und die damit verbundene Protonenschwamm-Funktion [Behr (1993)].



**Abbildung 1.2 Chemische Struktur eines linearen Polyethylenimines**

Aufgrund der Molekülgröße und der Verzweigkeit des Polyethylenimins ergeben sich Unterschiede in der Toxizität und der Transfektionseffizienz [Fischer et al. (2003), Ogris et al. (1998), Werth et al. (2006)]. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Polyethylenimine nicht nur zur Transfektion von DNA, sondern auch zur Transfektion von siRNAs [Hassani et al. (2005), Read et al. (2005), Urban-Klein et al. (2005)] und Ribozymen [Aigner et al. (2002)] eingesetzt werden können. Die Transfektionseigenschaften wurden bei verschiedenen Zelllinien in vitro als auch in vivo beschrieben [Abdallah et al. (1996), Zaric et al. (2004)].

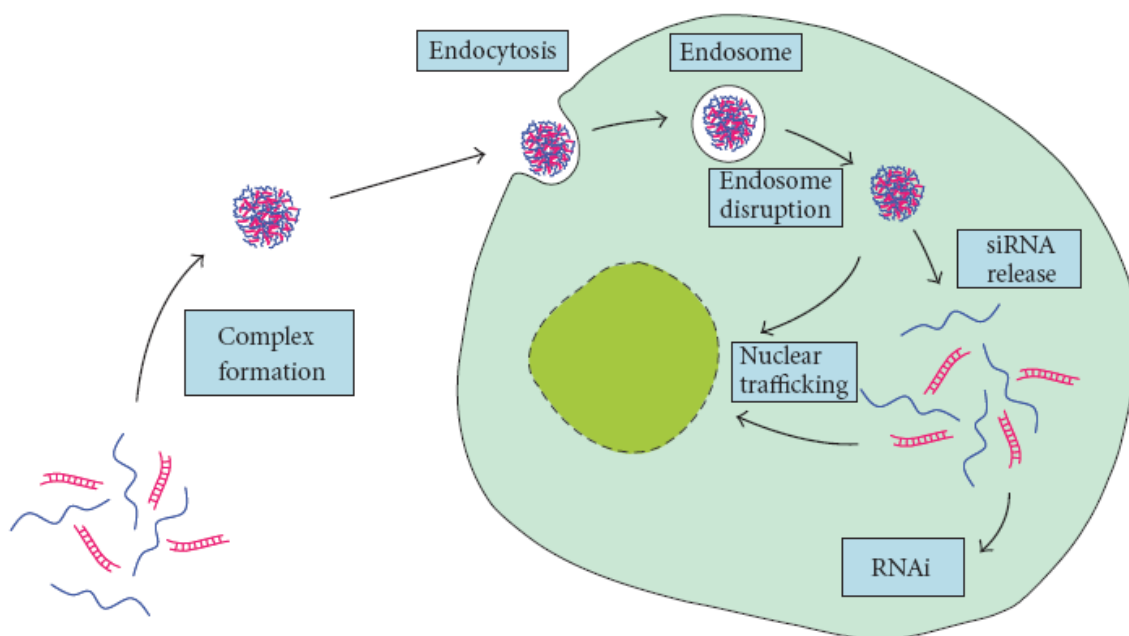


**Abbildung 1.3 Chemische Struktur eines verzweigt-kettigen Polyethylenimines**

Verzweigte PEIs besitzen bessere Transfektionseffizienzen als unverzweigte PEIs gleicher Masse, da sie kleinere Komplexe bilden [Neu et al. (2005)]. Sie weisen aber eine höhere Zytotoxizität auf. Ebenfalls entscheidend für die Transfektionseffizienz ist das Verhältnis der kationischen Stickstoffatome (N) im PEI zur Anzahl der anionischen Phosphoratome (P) der Nukleinsäuren und so muss für das entsprechende PEI das optimale N/P-Verhältnis ermittelt werden [Honore et al. (2005)]. Bei zu geringer Positivladung ( $N > P$ ) der PEI/Nukleinsäuren-Komplexe können diese nicht mit der Zellmembran interagieren und werden nicht aufgenommen. Bei zu hoher Positivladung ( $P > N$ ) wirkt PEI vermehrt toxisch.

Durch elektrostatische Wechselwirkungen ist PEI in der Lage, mit negativ geladener DNA oder siRNA Komplexe zu bilden [Aigner (2006)]. Dies führt zu einer Verdichtung der PEI/Nukleinsäuren-Partikel, welche nach Komplexierung mit den Nukleinsäuren eine positive Nettoladung besitzen. Die PEI/siRNA oder PEI/DNA-Komplexe interagieren an der Zellmembran und werden dort durch Endozytose in die Zellen aufgenommen. In den Endosomen können sich Protonen an freie N-Atome des PEI anlagern und führen zu einem Nachstrom von  $\text{Cl}^-$  und  $\text{H}_2\text{O}$ . Die Protonenschwammhypothese [Behr (1993)] erklärt die osmotische Schwellung aufgrund des Protoneneinstroms sowie das Platzen der endosomalen Vesikel und damit die Freisetzung der PEI/DNA- oder PEI/siRNA-Komplexe im Zytosol [Kichler et al. (2001)].

Durch die ausgezeichnete Pufferkapazität des PEIs kann dieses den Protoneneinstrom in das Lysosom abpuffern und damit die Ansäuerung verhindern, die zur Degradation der DNA oder siRNA führen würde. Ein Vorteil der PEI-vermittelten DNA- sowie siRNA-Transfektion ist zusätzlich der Schutz der Nukleinsäuren vor Nukleasen [Godbey et al. (2000), Brus et al. (2004)b]. Grosse et al. zeigten, dass die Aufnahme der PEI/Nukleinsäure-Komplexe in den Zellkern v. a. in der Mitose stattfindet, wenn die Zellkernmembran vorübergehend zusammenbricht [Grosse et al. (2006)]. Der genaue Mechanismus, wie die PEI/Nukleinsäure-Komplexe in den Zellkern gelangen, ist noch unklar.



**Abbildung 1.4** Transportweg des PEI/siRNA-Komplexes in die Zelle und Darstellung des „Protonen-Sponge Effect“ [Aigner (2006)]

Moghimi et al. konnten 2005 in vitro durch Polyethylenimine bedingte Zellnekrose und Apoptose beobachten. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass verzweigte (25 kDa) und lineare (750 kDa) PEI-Moleküle die Zellmembran beschädigen und Apoptose initiieren können. In ihrer Versuchsreihe konnten 30 Minuten nach Zugabe von PEI Nekrose-ähnliche Veränderungen beobachtet werden, die durch kompromittierte Membranintegrität und Lactatdehydrogenase-Freisetzung sowie Translokation von Phosphatidylserin von der inneren Plasmamembran zur Zelloberfläche verursacht wurden. Nach 24 h erfolgte die Aktivierung des "mitochondrial vermittelten Apoptose-

Programms", ausgelöst durch PEI-induzierte Kanalbildung in der äußeren Membran der Mitochondrien. Dies führte zur Freisetzung von proapoptotischen Cytochrom C und anschließend zur Aktivierung von Caspase 3 sowie zur Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials als Folge von Caspase-Translokation in die Mitochondrien [Moghimi et al. (2005)].

Für die erhöhte Zytotoxizität wird ebenfalls eine Interaktion aggregierter kationischer Komplexe mit der Zellmembran verantwortlich gemacht, die zur Destabilisierung und folgend zur Nekrose der betroffenen Zellen führen kann [Fischer et al. (2003)]. Auch freie Polymermoleküle sollen zur Toxizität des PEIs mit beitragen [Boeckle et al. (2004)]. Dennoch ist ein Überschuss an Polykationen notwendig, da die kationische Oberflächenladung die Interaktion mit der negativ geladenen Zellmembran bedingt und somit für die Aufnahme der Komplexe in die Zelle wichtig ist [Labat-Moleur et al. (1996)]. Um die Toxizität des PEIs zu senken, wurden modifizierte Polyethylenimine z. B. mit Polyethylenglycol (PEG) [Neu et al. (2005)] oder Chitosane [Jiang et al. (2008)] gekoppelt.

## 2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung und Charakterisierung des Low molecular weight Polyethylenimins F25-LMW-PEI mit möglichst hoher Transfektionseffizienz und geringer Zytotoxizität. Zur Herstellung des Transfektionsreagens F25-LMW-PEI wurde ein 25 kDa HMW-PEI durch Anwendung der Gel-Permeationschromatographie fraktioniert.

Zunächst sollten unter verschiedenen Transfektionsbedingungen wie den für die Komplexierung verwendeten Lösungen (150 mM NaCl, 5% Glucose oder dem Puffer NaCl-HEPES) und dem PEI/DNA-Mischungsverhältnis die Versuche zur DNA-Transfektionseffizienz an SKOV3-Zellen erfolgen.

Der PEI/siRNA-vermittelte spezifische Gen-Knockdown sollte durch Co-Transfektionen von DNA und siRNA bei SKOV3-Zellen sowie in stabil Luciferase-exprimierenden SKOV3-10-Zellen untersucht werden. Hier wurde durch den PEI/siRNA-vermittelten Genknockdown eine verminderte Luciferase-Aktivität der Zellen erwartet. Bei diesen in vitro Versuchen sollte ferner die Möglichkeit einer Lagerung der PEI/Nukleinsäure-Komplexe durch Lyophilisierung analysiert werden.

Die Effekte der Herunterregulation von VEGF in der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 und von PTN in der Glioblastomzelllinie U87 durch F25-LMW-PEI/siRNA-vermitteltes Gen-Silencing sollten bezüglich einer verminderten Proliferation der Zellen im WST-Proliferationsassay, durch einen verminderten mRNA-Nachweis im Northern Blot oder verminderten Proteingehalt im Serum untersucht werden.

Auch bei den Versuchen zur Auswirkung der Herunterregulation eines tumorrelevanten endogenen Genproduktes wie VEGF oder PTN sollte die Möglichkeit einer Lyophilisierung der PEI/siRNA-Komplexe untersucht werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte und Zubehör

Analysenwaage	Mettler-Toledo, Giessen
BioMax Expositionskassette	Kodak GmbH, Stuttgart
Brutschrank	Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA
Durchlichtmikroskop	Hund GmbH, Wetzlar
Einhängethermostat	Julabo Labortechnik, Seelbach
Electrophoresis Documentation and Analysis System 120	Kodak GmbH, Stuttgart
ELISA-Reader	MWG Biotech AG, Ebersberg
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Gelkammer	Bio-Rad Laboratories, München
GeneQuantII Photometer	Amersham Bioscience Europe, Freiburg
Helios $\gamma$ (Photometer)	Unicam Instruments, Cambridge, UK
Hybridisierungssofen	Biometra GmbH, Göttingen
Hypercassette™ Expositionskassette	Amersham Bioscience Europe, Freiburg
37°C-Inkubator mit CO <sub>2</sub> - Zusatz	Heraeus Instruments, Hanau
Luminometer	Berthold, Vista, CA, USA
Mikropipetten	Gilson, Middleton, WI, USA
Mikrowelle	Sharp Electronics, Hamburg
MRX Microplate Reader	Dynatech Laboratories, Denkendorf
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Optipure Analytical	Membra Pure, Bodenhhausen
pH-Meter GPHR 1400 A	Greisinger Electronic, Regenstauf
Phosphorimager SI	Amersham Biosciences GmbH Europe, Freiburg
Phosphorscreen	Amersham Biosciences GmbH Europe, Freiburg



Power Pac300 Netzteil	Bio Rad Laboratories, München
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Schüttelinkubator	Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA
Sterilbank Hera Safe	Heraeus Instruments, Hanau
UV-Transilluminator 2.000	Bio-Rad Laboratories, München
Varioklav® Dampfsterilisator	H + P Labortechnik, Oberschleißheim
Vortexer	Janke + Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen
Zentrifugen	Heraeus Instruments, Hanau
	DuPont De Nemours, Bad Nauheim

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

BioMax MS Film	Kodak GmbH, Stuttgart
Combitips für Multipette	Eppendorf, Hamburg
Hyperfilm™ ECL	Amersham Bioscience Europe, Freiburg
Einmal-Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
1,5 ml Gefäße mit Sterilfilter	Corning, NY, USA
Mikroschraubröhre, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
Millex®-GS syringe driven filter unit (0,22 µm)	Millipore, Bedford, MA, USA
MpITI Guard Filterspitzen	Sorensen BioScience, Utah, USA
Nitrocellulosefilter	Schleicher & Schuell BioScience, Dassel
Nylonmembran Hybond N+	Amersham Bioscience Europe, Freiburg
Pasteur-Pipetten	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Petrischalen	Cellstar, Briercroft, Texas, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Polystyrol-Rundbodenröhrchen (75*12 mm)	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
15 ml, 50 ml Reagenzröhren	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf

1,5 ml/ 2 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
Whatman-Papier	Whatman International/Maidstone, UK
6-, 24-, 96-Well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf

### 3.1.3 Zelllinien und Zellkulturmedien

Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
E. coli DH5α	Pharmacia, Erlangen
FCS (fetales Kälberserum), steril	PAA Laboratories, Linz, Österreich
IMDM (10x)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
IMDM-Medium	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mycokill AB, 50x	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Plasmocin™	InvivoGen, San Diego, USA
Prostatakarzinom-Zelllinie PC3	ATCC, Manassas, VA, USA
Ovarialkarzinom-Zelllinie SKOV3	ATCC, Manassas, VA, USA
Luciferase-exprimierende Zelllinie SKOV3-10	Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Philipps-Universität Marburg
Humane Glioblastom-Zelllinie U87	ATCC, Manassas, VA, USA
Viralex™ Trypsin/ EDTA	PAA Laboratories, Linz, Österreich

### 3.1.4 Chemikalien und Puffer

Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
BSA	Carl Roth, Karlsruhe
DEPC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Carl Roth, Karlsruhe

Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Formamid	Fluka BioChemika, Neu-Ulm
Dokumol S/W-Entwickler	Tetenal GmbH, Norderstedt
Glucose 5%	B. Braun, Melsungen
Glycerol	Merck, Darmstadt
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
HMW-PEI	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
Isopropanol	Acros Organics, Geel, Belgien
Kaliumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
25 kDa PEI	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
Kupfer(II)acetat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
NaCl, 150 mM, pH 7,4, steril, RNase frei	Riedel de Haen-Seelze, Seelze
peqGold Universal Agarose	peqlab Biotechnologie, Erlangen
PBS, steril	PAA Laboratories, Linz, Österreich
RNase Erase™	Qbiogene, Heidelberg
Sephadex™ G25 fine	Amersham Bioscience Europe, Freiburg
Sephadex™ G50 fine	Amersham Bioscience Europe, Freiburg
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Riedel de Haen-Seelze, Seelze

### 3.1.5 Kits, Enzyme und Marker

Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche, Mannheim
Luciferase-Assay System	Promega, Mannheim
peqGOLD DNA Leitemix (0,1-10 kbp)	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

peqGOLD RNApure™

peqlab Biotechnologie GmbH,  
Erlangen

Plasmid purification kit

NucleoBond, Düren

### 3.1.6 Oligonukleotide und Plasmide

DNA-Luciferase-Expressionsvektor

pGI3-basic (Promega),

mit eingefügtem NFκB-Promoter

Institut für Pharmakologie und  
Toxikologie, Philipps-Universität  
Marburg

DNA-Luciferase-Expressionsvektor

pGI3-control

Promega, Mannheim

DNA-Plasmid pRc-CMV

Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA

pGI2 (Luciferase GL2 siRNA)

MWG Biotech, Ebersberg

pGI3 (Luciferase GL3 siRNA)

MWG Biotech, Ebersberg

PTN siRNA

MWG Biotech Ebersberg

VEGF siRNA

MWG Biotech Ebersberg

### 3.1.7 Antikörper

Anti-PTN-Detection Ak, biotinyliert

R & D Systems

Rh Pleiotrophin

R & D Systems

PTN-Antikörper für coating

Marc Vigny, INSERM

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Gel-Permeationschromatographie zur PEI-Fraktionierung**

Zur Herstellung eines niedermolekularen PEI aus einem käuflich erworbenen hochmolekularen 25 kDa-Polyethylenimin von Sigma wurde dieses über Gel-Permeationschromatographie fraktioniert.

Für die Vorbereitung des Säulenmaterials wurden 3 g Sephadex G-50 fine™ Harz mit 300 ml 150 mM NaCl versetzt. Nach Aufquellen des Materials wurden mögliche Bindungen für PEI durch Zugabe von ca. 500 mg 25 kDa PEI geblockt und die Suspension bei 4°C über Nacht inkubiert. Eine 50 cm lange Säule mit einem Durchmesser von 1,5 cm, die zur Auftrennung der PEI-Moleküle unterschiedlicher Größe diente, wurde mit dem mit PEI abgesättigtem Säulenmaterial, welches vorher noch unter Vakuum entgast worden war, befüllt und zunächst mit 200 ml 150 mM NaCl bei einer konstanten Flussrate von 1 ml/min äquilibriert.

Für die Chromatographie wurden 50 mg 25 kDa PEI in 1 ml 150 mM NaCl durch kräftiges Schütteln aufgelöst und die Säule mit der 50 mg/ml-Verdünnung kontinuierlich und ohne Lufteinschlüsse befüllt. Durch Verwendung einer Peristaltikpumpe wurde mit der Fraktionierung begonnen und etwa 80 bis 100 Fraktionen mit einem Volumen von je 1 ml gewonnen. Die eingestellten Voreingaben von Durchflussrate und Zeit zur Gewinnung der 1 ml-Fractionen wurden dann während eines Laufs möglichst nicht mehr verändert.

### **3.2.2 PEI-Quantifizierung (Konzentrationsbestimmung)**

Um die PEI-Konzentrationen der einzelnen Fraktionen zu ermitteln, wurden 90 µl/Well eines Kaliumacetat-enthaltenden Reagenzes in eine 96-Well-Platte pipettiert und dazu 10 µl der zu messenden Fraktion oder einem PEI-Standard hinzugefügt.

#### Lösung zur PEI-Konzentrationsbestimmung

0,02 M Kupferacetat

5% Kaliumacetat in H<sub>2</sub>O  
pH 5,5

Nach vorsichtigem Schütteln der Platte wurde die Absorption der einzelnen Wells bei 630 nm in einem ELISA-Reader gemessen. Mittels einer erstellten Standardkurve und Regressionsgraden, basierend auf nachfolgender PEI-Eichreihe, konnten die Konzentrationen der einzelnen Fraktionen abgelesen werden. Durch Auftragen der PEI-Konzentrationen der einzelnen Fraktionen in einem Liniendiagramm konnte ein Elutionsprofil für jeden Fraktionierungslauf erstellt werden.

#### PEI-Standardreihe

50 mg/ml PEI- Lösung  
10 mg/ml PEI- Lösung  
5 mg/ml PEI- Lösung  
1 mg/ml PEI- Lösung  
0,5 mg/ml PEI- Lösung  
0,1 mg/ml PEI- Lösung  
0,05 mg/ml PEI- Lösung  
0,01 mg/ml PEI- Lösung  
150 mM NaCl (Nullwert)

Je nach Lage auf der Elutionsgeraden wurden 4 Fraktionen zusammengeführt und nochmals die Konzentration dieser gepoolten Fraktionen nach obiger Methode gemessen. Danach folgten dann die Transfektionsversuche mit den verschiedenen PEI-Fraktionen und dem Luciferase-Expressionsplasmid. Die Fraktionen, die die höchste Transfektionseffizienz aufwiesen, lagen auf dem absteigenden Anteil des PEI-Konzentrationspeaks. Diese zusammengeführten Fraktionen wurden als F25-LMW-PEI bezeichnet. Das F25-LMW-PEI wurde steril filtriert und in sterile 2 ml-Glasflaschen mit Deckel bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Die Transfektionseffizienz und Toxizität des F25-LMW-PEI wurde dann in folgenden Konzentrations- und Transfektionsversuchen untersucht.

### 3.2.3 Zellkultur und steriles Arbeiten

Für die Untersuchung der Transfektionseffizienz von F25-LMW-PEI und der Herunterregulation sezernierter Proteine durch spezifische siRNA, wurden folgende stabile Tumorzelllinien verwendet:

SKOV3-Zellen:	humane Ovarialkarzinom-Zelllinie
SKOV3-10-Zellen:	stabil Luciferase-exprimierende Ovarialkarzinom-Zelllinie
U87-Zellen:	humane Glioblastom-Zelllinie
PC3-Zellen:	humane Prostatakarzinom-Zelllinie

#### Einhaltung von Sterilität und Sauberkeit

Bei den Arbeiten in der Zellkultur musste in besonderer Weise auf Sterilität geachtet werden, um Kontaminationen der kultivierten Zellen mit Bakterien zu vermeiden. Handschuhpflicht, Verwendung von sterilen Einweg-Materialien und häufige Desinfektion der Sterilbänke und Verbrauchsmaterialien mit 70% Ethanol dienten zum Schutz vor Kontaminationen, welche die Ergebnisse der Transfektionen von Zellen verfälschen bzw. ein Absterben der Zellen bewirken könnten. Um Mycoplasmen-Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Zellen regelmäßig nach Vorschrift über 2 Wochen mit Mycokill™ behandelt.

#### Kultivierung der Zelllinien

Die Inkubation der Zelllinien erfolgte in einem 37°C-Inkubator mit 5% CO<sub>2</sub>-Begasung. Um die Zellen zu kultivieren, wurden ca.  $2 \cdot 10^6$  Zellen in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche in 10 ml IMDM-Medium, mit 10%-igem FCS-Gehalt, ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 90-100% über mehrere Tage inkubiert.

Vor jeder Behandlung der Zellen wurden die verwendeten IMDM-Medien, das Trypsin und das PBS im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

### Passagieren der Zelllinien

Aus den Zellkulturflaschen mit einem annähernd konfluenten Zellrasen wurde das Zellmedium mit Hilfe von Pasteur-Glaspipetten abgezogen. Die auf dem Flaschenboden anhaftenden Zellen wurden mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 1,5 bis 2 ml Trypsin-EDTA versetzt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für ca. 5 min inkubiert. Durch die enzymatische Aktivität des Trypsins lösten sich die Zellen vom Zellkulturflaschenboden und ließen sich durch mehrmaliges Schütteln leicht vereinzeln. Die Enzymaktivität des Trypsins wurde durch Zugabe von 10 ml IMDM + 2% oder + 10% FCS aufgehoben. In einer Neubauerzählkammer wurden die Zellen in jeweils 4 großen Quadranten ausgezählt und nach folgender Formel die Zellzahl pro ml bestimmt:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{gezählte Zellzahl}/4) \times 10.000$$

Entsprechend den geplanten Versuchen wurden die ausgezählten Zellen nach gewünschter Zellzahl nun weiterbehandelt und in die entsprechenden Platten überführt. In 6-Well-Platten wurden im Allgemeinen 100.000 Zellen/Well, in 24-Well-Platten 60.000 Zellen/Well und in 96-Well-Platten entweder 750 oder 1.000 Zellen/Well ausgesät.

Die übrigen noch in der Zellsuspension vorhandenen Zellen wurden je nach Bedarf in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche in 10 ml IMDM + 10% FCS für spätere Versuche kultiviert.

### Einfrieren von Zellen

Zellen, die nicht weiter benötigt wurden, wurden eingefroren. Aus annähernd konfluenten Zellkulturflaschen wurde, wie oben beschrieben, zunächst das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen. Dieses wurde wiederum abgesaugt, in die Zellkulturflasche wurde ca. 2 ml Trypsin-EDTA gegeben und 5 min bei 37°C inkubiert, um die Zellen vom Boden zu lösen. Das Trypsin wurde durch die Zugabe von 10 ml IMDM + 10% FCS inaktiviert und diese Zellsuspension wurde bei 3.000\*g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml Einfriermedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in 1,5 ml Proben aliquotiert und langsam in einem mit



Isopropanol befülltem Einfriergefäß auf -80°C abgekühlt. In flüssigem Stickstoff erfolgte die dauerhafte Aufbewahrung der eingefrorenen Zellen.

#### Einfrier-Medium

IMDM-Zellkulturmedium  
20% FCS  
5% DMSO

Das Auftauen der Aliquots in einem 37°C warmen Wasserbad und die Aufnahme der Zellen in das 10% FCS-haltige IMDM-Medium erfolgten unter Einhaltung der Sterilität. Die in dem Einfriermedium suspendierten Zellen wurden in eine 10 ml 10% FCS-haltiges Medium beinhaltende Zellkulturflasche passagiert und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach ca. 4 h erfolgte ein Medienwechsel mit 10 ml IMDM + 10% FCS, da das im Einfriermedium enthaltende DMSO in warmen Zustand stark toxisch auf die Zellen wirkt.

### **3.2.4 Transfektionen**

Für die transienten Transfektionen wurden SKOV3-Zellen verwendet, die nach den unter 3.2.3 beschriebenen Bedingungen kultiviert wurden. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen vor geplanten Transfektionen mit Mycokill™ behandelt worden waren, um mögliche Mycoplasmen-Kontaminationen auszuschließen.

In den transienten Transfektionen sollte die PEI-Transfektionseffizienz sowie die Toxizität auf die Zellen überprüft werden. Dazu wurden zum einen verschiedene N/P-Verhältnisse ausgetestet und zum anderen zwischen den Lösungen 5% Glucose, 150 mM NaCl und dem Puffer NaCl-HEPES variiert.

Alle Transfektionsarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen in der Zellkultur. Alle evtl. nicht sterilen Reagenzien, die benötigt wurden, wurden zunächst steril filtriert.

#### **3.2.4.1 pH-Wert-Einstellung des Puffers/ der Lösung**

Vor jeder Transfektion wurde die verwendete 150 mM NaCl-Lösung auf den pH 7,4 eingestellt. Hierzu wurde das pH-Meter zunächst mit Standardlösungen von pH 4 und pH 10 geeicht. Danach erfolgte durch Titration die genaue Einstellung des pH-Wertes mit Hilfe von NaOH und HCl.

Die 5% Glucose-Lösung hatte einen voreingestellten pH-Wert von 7,4, der NaCl-HEPES-Puffer musste nur anfangs bei der Herstellung auf den pH-Wert von 7,4 eingestellt werden.

#### **3.2.4.2 Komplexierung**

Pro Well einer 24-Well-Platte wurden jeweils 0,25 µg pGL3-NFκB-DNA verwendet. Diese DNA wurde dann in 5% Glucose, 150 mM NaCl oder dem Puffer NaCl-HEPES aufgenommen, so dass genau 2,5 µl dieses DNA-Lösungsmittelgemisches zu jedem Well hinzupipettiert werden konnten. Bei jeder Transfektion wurden Wells im Überschuss berechnet, um einen Mangel an Reagenzien für die Transfektion zu vermeiden.

Bei der verwendeten siRNA handelte es sich um die gegen Luciferase-RNA gerichtete pGL3-siRNA, die folgend spezifische siRNA genannt wird und die ungerichtete, unspezifische pGL2-siRNA. Jeweils 10 pmol eines 20 mmolaren siRNA-Stocks wurden pro Well verwendet. Auch die siRNA wurde in einer bestimmten 5% Glucose-, 150 mM NaCl- oder NaCl-HEPES-Menge aufgenommen, so dass pro Well 2,5 µl siRNA in Lösung zur Verfügung stand. Von dem F25-LMW-PEI wurden 5,6 µl für 0,5 µg Nukleinsäure (0,25 µg DNA und 0,25 µg siRNA) verwendet, dies entspricht einem Massenverhältnis von 10 bzw. einem N/P-Verhältnis von 77.

Das PEI wurde ohne Verdünnung mit 5% Glucose, 150 mM NaCl oder dem Puffer NaCl-HEPES direkt zu den schon vereinigten siRNA- und DNA-Ansätzen hinzupipettiert. Es wurde kurz auf- und abpipettiert, um die einzelnen Bestandteile der Ansätze besser zu durchmischen. Wegen der Empfindlichkeit der siRNA sollte man die Ansätze nicht vortexen.

#### **3.2.4.3 Transiente Transfektionen**

Nach einer Stunde Komplexierungszeit bei Raumtemperatur wurden die Ansätze nochmals auf- und abpipettiert und dann die errechnete Menge der Ansätze auf die in der Zwischenzeit ausgesäten Zellen gegeben. Es wurde darauf geachtet, dass die verabreichte Menge nicht punktuell auf die Zellen pipettiert wurde, sondern gleichmäßig auf die Fläche eines Wells verteilt wurde. Die 24-Well-Platten wurden noch einmal vorsichtig geschüttelt, um eine bessere Verteilung der Transfektionsansätze im Medium und eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im Well zu erreichen. Die Platten wurden dann im Inkubationsschrank bis zur ersten Messung der Luciferase-Aktivität inkubiert.

#### **3.2.4.4 Co-Transfektionen**

Für die Co-Transfektionen wurden SKOV3-10-Zellen (überlassen von Beata Urban-Klein) verwendet, die in Vorversuchen stabil mit dem Vektor pGI3-NFκB transfiziert worden waren. Diese Zellen exprimieren stabil Luciferase.

Bei den Co-Transfektionen stabil-transfizierter SKOV3-10-Zellen wurden 0,5 µg pRC-CMV-DNA verwendet, die in 0,5 µl 5% Glucose, 150 mM NaCl oder dem Puffer NaCl-HEPES aufgenommen wurden. Die siRNA-Menge wurde im Gegensatz zu den transienten Transfektionen verdoppelt, so dass 1 µl siRNA in jeweils 5 µl 5% Glucose, 150 mM NaCl oder NaCl-HEPES pro Well verwendet wurde. Es wurde eine Mischung aus siRNA und DNA entsprechend der Lösung (5% Glucose, 150 mM NaCl oder NaCl-HEPES) hergestellt. Zu den einzelnen Ansätzen wurde dann das F25-LMW-PEI direkt hinzu pipettiert und nochmals gut durchmischt. Auf Vortexen wurde wegen der siRNA-Instabilität verzichtet. Nach einer Stunde Komplexierungszeit wurden die Ansätze auf die ausgesäten SKOV3-10 Zellen pipettiert.

#### **3.2.4.5 Transfektion für PTN-ELISA**

Zunächst wurden in einer 6-Well-Platte mit je 100.000 U87-Zellen pro Well in 1,5 ml 2% FCS-haltigem Medium die entsprechenden Transfektionen durchgeführt. Pro Well wurden 30 pmol bzw. 40 pmol spezifische PTN-siRNA oder als Negativkontrolle unspezifische Luciferase pGL2-siRNA eingesetzt. Die siRNA wurde in einem Verhältnis von 1:5 in Glucose aufgenommen. Von dem F25-PEI wurden 5,6 µl pro 10 pmol siRNA eingesetzt, d.h. pro Well wurden 16,8 µl bzw. 22,4 µl F25 verwendet und in einem Verhältnis von 1:5 mit Glucose versetzt. Die siRNA-Ansätze und PEI-Ansätze wurden zusammengeführt und 1 h komplexiert.

Die zu lyophilisierenden Ansätze wurden wie unter 3.2.5 beschrieben über Nacht in Eppendorfgefäßen gefriergetrocknet und erst am nächsten Tag in 5% Glucose aufgenommen und dann zu den vorbereiteten Zellen in eine 6-Well-Platte gegeben. Nach 4 h erfolgte ein Medienwechsel mit 10% FCS-haltigem IMDM-Medium. Nach 48 und 72 h wurde das Medium von den Zellen abgezogen und zunächst bei -20°C eingefroren.

#### **3.2.5 Lyophilisierung**

Die Lyophilisierung der hergestellten Komplexe diente zur Untersuchung der möglichen Kryokonservierung von PEI-Oligonukleotidkomplexen. In folgenden Transfektionen mit den kryokonservierten Ansätzen wurde nach deren Rehydratation die Transfektionseffizienz untersucht und mit denen nicht-lyophilisierter Ansätze verglichen.

Die Transfektionsansätze wurden wie zuvor beschrieben (3.2.4.3 Transiente Transfektionen und 3.2.4.4 Co-Transfektionen) hergestellt. Die Komplexierung der Ansätze fand bei Raumtemperatur statt und dauerte ca. 1 h. Nach der Komplexierungszeit wurden die Ansätze entweder in den zur Herstellung genutzten Eppendorfgefäßen belassen oder in 24-Well-Platten pipettiert. Diese Platten wurden dann offen in der Lyophille platziert, so dass eine gleichmäßige Lyophilisierung bei Vakuum und bei bis zu -80 °C erreicht werden konnte. Ein Problem stellte die Sterilität dar, die bei dem Verbleib der Platten und

Eppendorfgefäße in die Lyophille z. T. nicht zufrieden stellend gewährleistet werden konnte.

Nach abgeschlossener Lyophilisierung über Nacht wurden die lyophilisierten Ansätze in den Eppendorfgefäßen in 5% Glucose, 150 mM NaCl oder NaCl-HEPES aufgenommen und auf die Zellen verteilt. Es wurde genau das Volumen an Solvenz wieder hinzugefügt, welches vor der Lyophilisierung als Komplexlösung in die Eppendorfgefäße gegeben worden war. Danach wurden die Ansätze auf die in den 24-Well-Platten vorbereiteten 60.000 Zellen/Well in 2% FCS-haltigem IMDM-Medium pipettiert.

Auf die in den Wells der Platten lyophilisierten Ansätze wurden die ausgezählten Zellen in 2% FCS-haltigem Medium direkt hinzupipettiert und gleichmäßig verteilt. Nach ca. 2 h wurde nochmals kurz geschüttelt, um eine gleichmäßigere Verteilung der Zellen und des Transfektionsreagenz zu erreichen. Nach ca. 4 h erfolgte ein Medienwechsel der Zellen mit 10% FCS-haltigem Medium.

### 3.2.6 Luciferase-Aktivitätsmessung in Zelllysaten

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz des F25-LMW-PEI bei den transienten Transfektionen und Co-Transfektionen mit Luciferase-exprimierenden Vektoren und siRNA wurde eine Luciferase-Aktivitätsmessung vorgenommen. Mit Hilfe eines enzymatischen Tests wurde die Luciferase-Aktivität in den transfizierten Zelllysaten nachgewiesen. Als Luciferasesubstrat diente das Beetle Luciferin, welches durch die von den transfizierten Zellen exprimierte Firefly Luciferase (Cosubstrate ATP und  $Mg^{2+}$ ) zu Oxyluciferin umgesetzt wird.

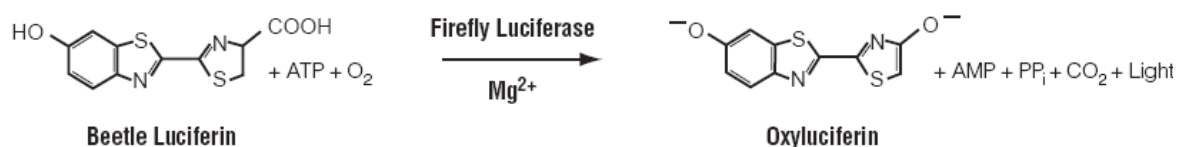


Abb. 3.1 Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin

Die dabei emittierte Lichtintensität konnte bis zu einer Minute nach der Reaktion in einem Luminometer detektiert werden und war direkt proportional zur Luciferase-Aktivität der Zellen. Die Aktivität der Firefly-Luciferase wurde entsprechend der Lichtintensität in RLU (Relative light units) angegeben.

Das Luciferase-Assay Kit wurde nach Herstellerangaben von Promega angewendet. Zunächst wurde das Zellmedium von den zu messenden Wells abgesaugt und pro Well einer 24-Well-Platte 1 x Lysepuffer hinzupipettiert, so dass der Boden des Wells gleichmäßig bedeckt war. Bei einer 24-Well-Platte wurden 200 µl des Lysepuffers pro Well verwendet. Die Platten wurden 10 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler stehen gelassen. Währenddessen wurde die entsprechende Anzahl der Polystyrolröhrchen zur Vorbereitung der Messung mit 50 µl Luciferasesubstrat versetzt.

Zur Messung wurden 10 µl des Zelllysats zu dem Luciferasesubstrat in die Polystyrolröhrchen hinzupipettiert, es wurde kurz geschwenkt und die Proben möglichst zügig im Luminometer gemessen. Im Luminometer erfolgte sofort die 10 sec dauernde Messung der emittierten Lichtintensität des umgesetzten Oxyluciferins. Bei Arbeiten mit dem Luminometer wurden keine Handschuhe getragen, da in vorherigen Messungen elektrostatische Wechselwirkungen des Luminometers mit Handschuhen zu Messungenauigkeiten und nachweisbar falschen Ergebnissen geführt hatten.

### **3.2.7 Transformation und Vermehrung von Bakterien, Präparation der Plasmid-DNA (Midi-Präparation)**

#### **3.2.7.1 Transformation kompetenter Bakterienzellen mit dem Vektor pGI3-NFκB**

0,2 ml des bei -80 °C gelagerten kompetenten Bakterienstamms E. coli DH5α wurden in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß auf Eis aufgetaut und mit 100 ng des zu vermehrenden Plasmids versetzt. Die Bakterien wurden dann 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 90 sec in einem Thermoblock auf 42 °C erhitzt. Wiederum folgte eine dreiminütige Abkühlung auf Eis. Nach dieser Behandlung wurden die Zellen mit 0,5 ml autoklaviertem LB-Medium versetzt und ca. 1 h bei 37°C und 150 rpm auf dem Schüttler inkubiert.

#### LB-Medium:

5 g Hefeextrakt  
10 g Trypton (aus Casein)  
10 g NaCl  
ad 1.000 ml H<sub>2</sub>O

Auf eine vorbereitete Kanamycin- oder Ampicillin-Agarplatte wurden 5 µl der im LB-Medium inkubierten Bakterienzellen ausplattiert, auf eine weitere Platte wurden 50 µl der Bakteriensuspension gegeben. Hierbei wurde auf die Einhaltung der Sterilität geachtet, um Kontaminationen weitgehend auszuschließen, indem im direkten Umfeld der Flamme eines Bunsenbrenners gearbeitet wurde. Diese Platten wurden dann über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

#### LB-Ampicillin-/ Kanamycin-Agarplatte

1,5% LB-Agar-Gemisch (2,25 g Agar Agar ad 150 ml LB-Medium) wird in der Mikrowelle eingeschmolzen oder autoklaviert  
Abkühlung auf ca. 55°C

Hinzufügen von 100 µg Ampicillin bzw. Kanamycin pro 1 ml  
LB-Agar-Lösung (150 µl einer Stammlösung)  
Ausgießen der LB-Agarlösung in sterile Petrischalen

Aufgrund der in dem Plasmid kodierten Ampicillin- bzw. Kanamycin-Resistenz, wuchsen über Nacht nur Bakterienkolonien, die das Plasmid pGI3-NFκB in das Bakteriengenom aufgenommen hatten.

Eine einzelne Bakterienkolonie wurde von der Agar-Platte gepickt und in 2 ml LB-Medium bei 37°C und 200 rpm auf dem Schüttler für 2 h inkubiert. Die vorkultivierten Ampicillin- bzw. Kanamycin-resistenten Klone wurden anschließend in 200 ml LB-Medium, welches mit 1µg/ml Ampicillin bzw. Kanamycin versetzt worden war, weiterhin bei 37°C und 200 rpm für ca. 12 h inkubiert.

#### **3.2.7.2 Bakterienzellen-Freeze down (pGI3-NFκB)**

Zur Aufbewahrung der Bakterienkolonien wurden diese kryokonserviert. Dazu wurde 1 ml der über Nacht in dem LB-Medium kultivierten Bakterienkolonie mit der gleichen Menge an Glycerin vermischt und in entsprechenden Gefäßen bei -80°C gelagert.

#### **3.2.7.3 Präparation der Plasmid-DNA (Midi-Präparation)**

Die Plasmid-DNA wurde nach dem Herstellerprotokoll des NucleoBond® Plasmid purification kit von Machery-Nagel präpariert.

Zunächst wurden die über Nacht in 200 ml LB-Medium kultivierten Bakterien für 15 min bei 4°C und 6.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakteriensediment mit 4 ml Puffer S1 resuspendiert. Dazu wurden 4 ml des Puffers S2 gegeben und gut gemischt. Danach wurde die Zellsuspension bei Raumtemperatur 5 min inkubiert, 4 ml des Puffer S3 hinzugegeben,



nochmals durchmischt und 5 min auf Eis inkubiert. Das Bakterienlysat wurde wiederum bei 12.000 rpm und 4°C für 35 min zentrifugiert. Währenddessen wurden die Ionenaustauschchromatographie-Säulen durch Auftragen von 2,5 ml Puffer N2 äquilibriert und anschließend mit dem durch die Zentrifugation gereinigtem Lysat aufgefüllt. Die Säule wurde zweimal mit je 5 ml Puffer N3 ausgewaschen. Durch Zugabe des Puffers N5 in die Säule wurde die Plasmid-DNA eluiert. Zur eluierten DNA wurden 3,5 ml Isopropanol (Raumtemperatur) langsam hinzugeträufelt und nochmals für 30 min bei 4°C und 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet, bestehend aus präzipitierter DNA, mit 5 ml sterilem 70% Ethanol vorsichtig gewaschen. Nach einer weiteren 20 min Zentrifugation bei 12.000 rpm und 4°C wurde die Flüssigkeit abpipettiert und das Pellet an der Luft für ca. 20 min getrocknet. Die Aufnahme der DNA erfolgte in 100 µl sterilem H<sub>2</sub>O bidest.

### **3.2.8 Quantifizierung von Nukleinsäuren: DNA- bzw. RNA-Konzentrations-Bestimmung**

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde die UV-Absorptionsspektroskopie verwendet. Zunächst wurde das Photometer bei einer Absorption von 260 nm mit H<sub>2</sub>O bidest auf Null eingestellt. Die Nukleinsäure-Lösungen wurden in einer Verdünnung von 1:50 oder 1:100 in die Quarzglasküvette pipettiert und ebenso die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Über die folgenden Formeln konnte dann die DNA- bzw. RNA-Konzentration bestimmt werden:

Konzentration DNA (in ng/µl) =  $A(nm) \times \text{Verdünnung} \times 1 \text{ cm (Küvette)} \times \text{Faktor } 50$

Konzentration RNA (in ng/µl) =  $A(nm) \times \text{Verdünnung} \times 1 \text{ cm (Küvette)} \times \text{Faktor } 40$

Über die Bestimmung des Verhältnisses der Absorptionen: A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>, das zwischen 1,7 und 2,0 liegen sollte, konnte zusätzlich eine Aussage über die

Verunreinigung der DNA bzw. RNA mit Proteinen, freien Nukleotiden oder Phenol gemacht werden [Ausubel et al. (1998)].

### **3.2.9 RNA-Präparation**

Die Extraktion der RNA aus den transfizierten Tumorzellen erfolgt mit Hilfe von peqGOLD RNApure™, einem gebrauchsfertigen Reagenz zur Extraktion von RNA aus mammalien Zellen nach Herstellerprotokoll der Firma peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen.

Bei der Arbeit mit RNA wurde zum Schutz vor RNAsen grundsätzlich mit Handschuhen und auf Eis gearbeitet, verwendete Gerätschaften oder Materialien wurden zunächst mit RNase Erase™ abgewischt.

Es wurde ausschließlich DEPC-behandeltes Wasser genutzt. Diethylpyrocarbonat bindet kovalent an primäre und sekundäre Amine, z.B. Histidin, welches sich im katalytischen Zentrum vieler RNasen befindet. Zur Herstellung von DEPC-Wasser setzte man eine 0,5%-ige DEPC-Lösung in sterilem Wasser an, inkubierte diese über Nacht bei Raumtemperatur und autoklavierte sie anschließend. Das DEPC zerfällt dabei zu CO<sub>2</sub> und Ethanol.

#### **3.2.9.1 Homogenisieren der Zellsuspension**

Das Medium eines Wells einer 6-Well-Platte mit ca. 100.000 Zellen wurde abgesaugt und 0,5 ml peqGOLD RNApure hinzupipettiert. Der Inhalt wurde dann mehrmals zur Lyse der Zellen auf- und abpipettiert und in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt. Dieser Arbeitsschritt erfolgte aufgrund des gesundheitsschädlichen Phenol- und Guanidinisothiocyanat-Gehaltes von peqGOLD RNApure™ unter dem Abzug.

### **3.2.9.2 Phasentrennung**

Das Extrakt wurde 5 min auf Eis gelagert. Zu 1 ml peqGOLD RNApure™ wurden dann 0,2 ml Chloroform hinzugegeben und ca. 15 sec kräftig geschüttelt. Danach wurden die Eppendorfgefäße ca. 5 bis 10 min auf Eis stehen gelassen, bis die obere Phase im Eppendorfgefäß nicht mehr rosa, sondern weißlich durchsichtig erschien. Anschließend wurde bei 4°C bei 13.000\*g für 15 min zentrifugiert, dadurch wurde die Probe in 3 Phasen getrennt.

### **3.2.9.3 Präzipitation der RNA**

Die obere wässrige Phase mit der gelösten RNA wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, in welches vorher schon 0,5 ml Isopropanol hineinpipettiert worden war. Die Proben wurden für 5-15 min auf Eis gelagert, dann bei 13.000\*g und 4°C für 15 min zentrifugiert.

### **3.2.9.4 Waschen der RNA**

Der Isopropanolüberstand wurde langsam dekantiert oder mit Hilfe einer Pipette abgezogen und das Pellet zweimal mit 70%-igem -20°C kaltem Ethanol gewaschen, indem das Eppendorfgefäß mehrmals invertiert, nicht aber gevortext wurde, um die RNA nicht zu zerstören. Dann wurde nochmals bei 13.000\*g und 4°C 15 min zentrifugiert.

### **3.2.9.5 Lösen der RNA**

Der Überstand wurde dekantiert, das RNA-Pellet an der Luft für ca. 20 min getrocknet.

Die RNA wurde dann in 20 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und die Konzentration mit Hilfe des Photometers bei einer Absorption von 260 nm bestimmt.

### 3.2.10 Northern-Blot

Für die Auftrennung der RNA wurden Agarose-Gele verwendet, die während der Zentrifugationszeiten der RNA-Präparation für eine 200 ml-Gelbox vorbereitet wurden. 2 g Agarose wurden in 175 ml H<sub>2</sub>O aufgekocht und es wurde darauf geachtet, dass keine Schlieren in der Lösung entstanden. Unter dem Abzug wurden 20 ml 10 x MOPS running buffer sowie 5 µl des Ethidiumbromid, welches die RNA unter UV-Licht sichtbar macht, hinzugefügt. Nach Abkühlung der Agar-Lösung auf ca. 55 bis 60°C wurden 5 ml 37% Formaldehyd vorsichtig hinzupipettiert. Die Gellösung wurde in die vorbereiteten Gelkammern gegossen und erstarrte.

#### 10 x MOPS running buffer

0,4 M (83,72 g/l) MOPS pH 7,0  
0,1 M (13,61 g/l) Natriumacetat  
0,01 M (3,72 g/l) EDTA  
H<sub>2</sub>O ad 1 l  
steril filtrieren und dunkel lagern

#### Gel- Puffer

1,5 bis 2 l 1 x MOPS running buffer

Zu einer RNA-Probe wurden 20 µl des Ladepuffers hinzupipettiert und diese Mischung dann im Hitzeblock bei 65°C für ca. 10 min erhitzt und folgend kurz auf Eis abgekühlt. Das entstandene Kondenswasser wurde herunterzentrifugiert und das Gel dann mit den vorbereiteten Proben beladen. Als Referenz diente ein Standard mit RNA-Fragmenten definierter Größe (peqGOLD RNA Leitemix [0,1-10 kbp]).

#### Premix-Ladepuffer

10 µl Formamid  
3,5 µl Formaldehyd  
2 µl 10 x MOPS Laufpuffer  
2 µl loading dye (glycerinhaltig)

ad 20 µl H<sub>2</sub>O  
1 min abzentrifugieren

Die RNA-Proben wurden bei 25 V zunächst langsam in das Gel einlaufen gelassen, dann wurde die Voltzahl auf 80 V erhöht. Die Laufzeit der Gelelektrophorese betrug im Durchschnitt ca. 1 ½ bis 2 h.

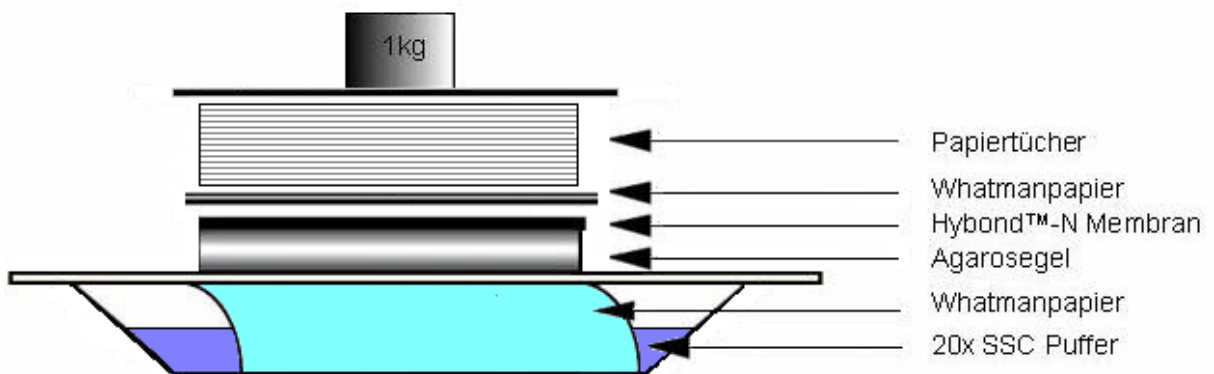
Die Detektion von Nukleinsäuren in den Agarose-Gelen erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht (Wellenlänge  $\lambda=254$  nm). Dabei wurden Ethidiumbromid-Moleküle, die in Nukleinsäuren interkalieren, zu einer sichtbaren Fluoreszenz ( $\lambda=560$  nm) angeregt. Zur Dokumentation wurden die Gele zunächst fotografiert und der Transfer auf die positiv geladene Nylonmembran vorbereitet.

Eine Plastikwanne wurde mit 20 x SSC befüllt und darüber eine Glasplatte gelegt, auf der mit SSC angefeuchtetes Whatman-Papier lag, dessen Enden in das 20 x SSC der Wanne hinein reichten.

#### 20 x SSC

175 g NaCl  
88 g Na<sub>3</sub>Citrat·H<sub>2</sub>O  
H<sub>2</sub>O ad 1 l  
pH 7

Das Gel wurde mit den Taschen nach unten auf das feuchte Whatman-Papier gelegt, dann folgte das luftblasenfreie Auflegen der auf das Gel passend zurechtgeschnittenen feuchten Nylonmembran. Anschließend wurden 3 Lagen mit 20 x SSC befeuchtetes Whatman-Papier aufgebracht, gefolgt von 6-8 Lagen trockenem Whatman-Papier. Es folgten passend auf das Gel zugeschnittene trockene Papiertücher, die ca. 8-10 cm hoch gestapelt wurden. Um das Gel herum wurde noch eine Parafilmisolierung angebracht. Der Blot wurde mit einem Gewicht von 1 kg beschwert und über Nacht erfolgte der Transfer auf die Membran durch Kapillarsogkräfte.



### 3.2 Northern Blot Apparaturaufbau

Nach ca. 12 h wurde der Blot abgebaut und die Membran auf dem UV-Transilluminator einem Crosslinking unterzogen. Durch die UV-Strahlung wurde die einzelsträngige RNA an der Membran fixiert.

Bei 80°C wurde die Membran dann 2 h in einem Trockenschrank gelagert. Dieses so genannte baking fixiert die RNA-Moleküle auf der Nylonmembran durch Ausbildung von Bindungen zwischen den Basen der RNA und den positiv geladenen Aminogruppen der Nylonmembran.

Für 3 h wurde die Membran anschließend bei 42°C in einer Prähybridisierlösung im Hybridisierofen rotiert, um unspezifische Bindungsstellen für die Sonde zu blockieren. Durch die Rotation im Hybridisierofen wurde die Membran gleichmäßig benetzt.

#### Northern-Prähybridisierlösung (für Nylonmembranen)

- 5 ml Formamid
- 2,5 ml 20 x SSC
- 1 ml 50 x Denhardt
- 500 µl 10 % SDS
- Steriles, mit DEPC behandeltes H<sub>2</sub>O ad 10 ml
- 100 µl denaturierte (5 Minuten 100°C) Salmon-Sperm DNA-Lösung

#### Denhardt's Lösung

- 2% Ficoll 40
- 2% Polyvinylpyrrolidon

2% BSA (FraktionV)

in sterilem, mit DEPC behandeltem H<sub>2</sub>O

Während der Hybridisierung wurde die zuvor auf 100°C erhitzte PTN-Sonde der Prähybridisierungslösung zugefügt und über Nacht bei 42°C rotiert. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung entfernt und es folgten zwei 15 min Waschschrte mit 2 x SSC/0,1% SDS. Die Nylonmembran wurde dann in Frischhaltefolie eingewickelt, es erfolgte die Filmexposition auf einer mit Verstärkerfolie versehenen Hyperkassette™. In der Dunkelkammer wurde hierzu der Nylonmembran ein BioMax MS Film aufgelegt. Der Film wurde anschließend bei -80°C gelagert, wobei die Expositionszeit sich nach der Strahlungsintensität der Proben richtete.

Die Filmentwicklung erfolgte in der Dunkelkammer: der BioMax MS Film wurde in das Entwicklerbad gelegt. Der Entwicklungsprozess wurde durch die Stopplösung gestoppt und der Film im Fixierbad fixiert. Nach Spülen mit H<sub>2</sub>O trocknete der Film bei Raumtemperatur.

#### Entwickler

1:6 Verdünnung des Dokumol SW-Entwicklers mit monodestilliertem H<sub>2</sub>O

#### Stopplösung

1% Essigsäure in monodestilliertem H<sub>2</sub>O

#### Fixierer

1,26 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·H<sub>2</sub>O

0,11 M K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Zur quantitativen Bestimmung des PTN-mRNA-Levels wurde der Blot auf einem Phosphorscreen exponiert. Die Expositionsdauer richtete sich nach der Strahlungsintensität der Proben.

Da verschieden hohe Mengen an Gesamt-RNA vorlagen, musste der Anteil von PTN-mRNA an der Gesamt-RNA bei jeder einzelnen Probe bestimmt werden. Um die Gesamt-RNA bestimmen zu können, wurde die Nylonmembran erneut prähybridisiert. In der Hybridisierung wurde eine für 18S-RNA spezifische

Sonde verwendet. Es folgte eine erneute Entwicklung und Messung der Strahlungsintensität im Phosphorimager. Anhand der Daten aus dem Phosphorimager konnte der PTN-mRNA-Anteil an der Gesamt-RNA durch Division ermittelt werden.

### **3.2.11 PTN-ELISA**

Die PTN-Konzentration im Zellüberstand und damit auch die verminderte PTN-Sekretion der U87-Zellen als Antwort auf ein erfolgtes PTN-siRNA-Targeting wurden mittels PTN-ELISA untersucht. Die Transfektion erfolgte wie unter 3.2.4.5 beschrieben.

Der U87-Zellrasen in den Wells wurde durch Verwendung von peqGOLD RNApure™ zur RNA-Präparation (siehe Kapitel 3.2.9) vorbereitet. In dem abgezogenen und vorerst eingefrorenen Medium sollte mittels PTN-ELISA die verminderte PTN-Sekretion nachgewiesen werden.

Eine 96-Well-ELISA-Platte wurde zunächst mit 100 µl/Well des monoklonalen PTN-Antikörper (Ascites), 1:5.000 in TBS bei 4°C über Nacht inkubiert.

#### 1 x TBS (Tris-buffered saline)

20 mM Tris-HCl

150 mM NaCl

pH-Wert-Einstellung auf 7,4 und Autoklavieren

#### TBST (Tris-buffered saline/Tween 20)

20 mM Tris-HCl, pH 7,5

150 mM NaCl

0,05% (w/v) Tween 20

Am Morgen erfolgten drei 5 min Waschungen der Wells mit je 200 µl 1 x TBST auf dem Schüttler. Die Blockierung unbesetzter Proteinbindungsstellen erfolgte 1 h mit 200 µl/Well einer Lösung aus 1% proteasefreiem BSA, 0,5 g/50 ml und 1 x TBST. Wiederum wurden die Wells dreimal 5 min mit 200 µl 1 x TBST bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gewaschen.



Die zu messenden Proben (aus den transfizierten Wells abgezogenes Medium) wurden 1:1 mit 1 x TBST verdünnt. 100 µl der so vorbereiteten Proben und eines angefertigten Standards wurden dann in die Wells der ELISA-Platte aufgetragen und bei Raumtemperatur 1 h auf dem Schüttler belassen.

Standardreihe mit rh Pleiotrophin von R&D Systems (50µg/ 500µl) in 1 x TBST

1.000 ng/ ml  
300 ng/ ml  
100 ng/ ml  
30 ng/ ml  
10 ng/ ml  
3 ng/ ml  
1 ng/ ml  
0 ng/ ml

Nach der Einwirkzeit wurden die Proben verworfen und die Wells erneut dreimal 5 min mit 1 x TBST gewaschen. Von in 1 x TBST zu 100 ng/ml verdünntem biotyniliertem Anti-PTN-Detection-Antikörper wurden 100 µl pro Well hinzupipettiert und es erfolgte eine Einwirkzeit von 1 h bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln. Danach wurde wiederum dreimal mit 1 x TBST gewaschen, gefolgt von der Zugabe von 100 µl/Well der Streptavidin-konjugierten alkalischen Phosphatase (200 ng/ml in 1x TBST). Eine Inkubation erfolgte 1 h bei Raumtemperatur, danach wurde wiederum dreimalig mit 1 x TBST gewaschen. Nach dem Waschen wurde in jedes Well 100 µl des p-Nitrophenyl-Phosphat-Substrates hinzu gegeben. Dieses Substrat wurde unter gleichmäßigem Schütteln lichtgeschützt ca. 1 h bei Raumtemperatur in den Wells belassen. Die alkalische Phosphatase spaltete den Phosphatrest vom farblosen Nitrophenylphosphat ab und es entstand *p*-Nitrophenol, welches schwach gelb ist. Diese Reaktion konnte in einem Photometer bei einer Extinktion von 405 nm gemessen werden. Die Intensität der Farbe war dabei proportional zu der Konzentration des entstandenen Nitrophenols und damit auch zu der Konzentration des zu bestimmenden PTNs in der Probe. Über Nacht wurde die ELISA-Platte bei 4°C im Dunkeln gelagert und am nächsten Morgen nochmals die Extinktion bei 405 nm gemessen.

Zur Quantifizierung wurde das Standard-rh-Pleiotrophin von R&D Systems (50 µg/500 µl) mit genauer Konzentrationsangabe verwendet. Aus der erstellten Verdünnungsreihe konnte durch Auftragen der gemessenen Extinktion im Verhältnis zur Konzentration in einem Diagramm eine Eichgerade erstellt werden. Aus der Gegenüberstellung der Extinktionswerte der Proben mit denen der Standardreihe konnten die Konzentrationen des sekretierten PTN im Medium direkt ermittelt werden.

### **3.2.12 Proliferations-Assay (WST-Assay)**

Für die Bestimmung und Quantifizierung der Zellproliferation und Zellvitalität wurde in dieser Arbeit der WST-Assay angewendet, der nach dem Tetrazoliumsalz WST-1 benannt ist. Dieser colorimetrische Assay basiert auf der Reduktion des wasserlöslichen, hellroten Tetrazoliumsalz WST-1 zu einem löslichen, dunkelroten Formazan. Diese Reaktion wird durch das mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System katalysiert, welches nur in vitalen Zellen aktiv ist. Die Menge des entstandenen Formazan-Farbstoffs korreliert direkt mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen.

Die Transfektionen erfolgten in 96-Well-Platten, wobei die äußeren Reihen der Platte nur mit 200 µl/Well PBS befüllt worden waren.

Nach ca. 24 h wurde die erste Messung durchgeführt und diente dann als Normierungsgrundlage für die zeitabhängigen Messungen.

Nach Aspiration des Mediums wurden 100 µl 2% FCS-haltiges IMDM-Medium und 10 µl WST1-Lösung pro Well hinzu pipettiert und genau 1 h bei 37°C inkubiert. Als Hintergrundkontrolle oder Nullwert diente ein gleich behandeltes Well ohne vorherige Zelleinsaat.

Die optische Dichte des entstandenen Formazan wurde mittels ELISA-Plattenlesegerät bei einer Absorption von 450 nm quantifiziert. Jeweils 8 bis 10 Wells wurden an einem Messtag untersucht, um Mittelwert und Standardabweichungen berechnen zu können.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Herstellung des niedermolekularen F25-LMW-PEI**

#### **4.1.1 Gel-Permeationschromatographie**

Die gelpermeationschromatographische Trennung der Lösung eines verzweigten 25-kDa-Polyethylenimins diente zur Herstellung des Low molecular weight Polyethylenimins F25-LMW-PEI mit möglichst hoher Transfektionseffizienz und geringer Toxizität.

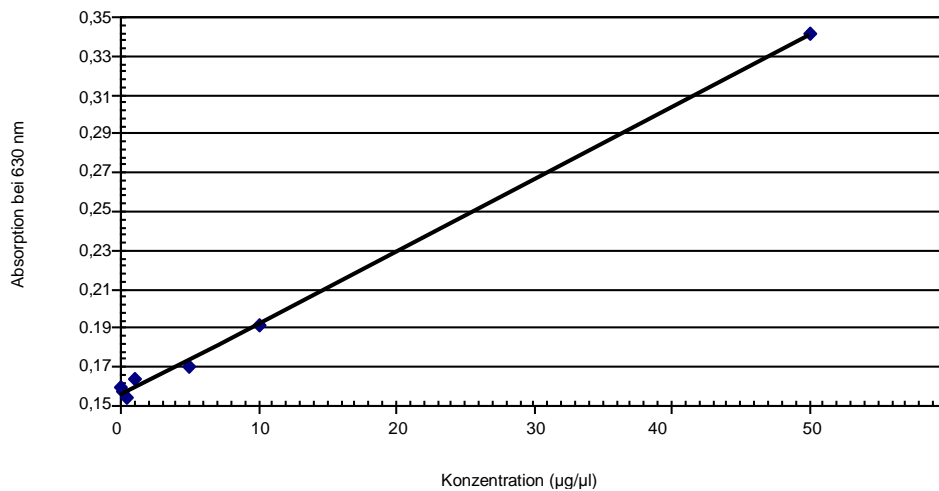
Ein käuflich erworbenes 25-kDa PEI wurde durch die Größenausschluss-Chromatographie nach Molekulargewicht in einzelne 1 ml Fraktionen aufgetrennt, da in dem synthetisch hergestellten, verzweigt-kettigen Polyethylenimin Moleküle unterschiedlicher Molekülgröße vorliegen. Die Trennung erfolgte nach dem hydrodynamischen Volumen der Moleküle in Lösung. Kleinere Moleküle mit einem geringeren Molekulargewicht diffundierten tiefer in die Poren der mit dem Kunstharz Sephadex<sup>TM</sup> G50 fine befüllten Trennsäule als größere mit höherem Molekulargewicht. Die größeren Moleküle bewegten sich schneller durch die Säule und befanden sich somit in den vorderen gesammelten Fraktionen.

Die Säulen wurden zunächst mit PEI-Proben kalibriert, deren Moleküle ein bekanntes Molekulargewicht besitzen. Während eines Fraktionierungs-Laufs des 25-kDa PEIs wurden 80 bis 100 1 ml Fraktionen gesammelt.

#### **4.1.2 Konzentrationsbestimmung durch Verwendung einer Standardreihe und Erstellung einer PEI-Eichgeraden**

Zur Konzentrationsbestimmung der gesammelten Fraktionen wurden nach Cu-Komplexierung deren Absorptionen mittels ELISA-Plattenlesegerät bestimmt und mit den Absorptionen einer bekannten PEI-Standardreihe mit festgelegten Konzentrationen verglichen. Die Konzentration der einzelnen Fraktionen konnte dann mit Hilfe der Kenntnis der Konzentrationen aus der vorliegenden PEI-Standardreihekurve berechnet werden. Exemplarisch abgebildet ist in Abb. 4.1

eine solche PEI-Standardkurve, die durch eine Verdünnungsreihe einer 50 mg/ml PEI-Stammlösung, wie in 3.2.2 beschrieben, erstellt wurde.



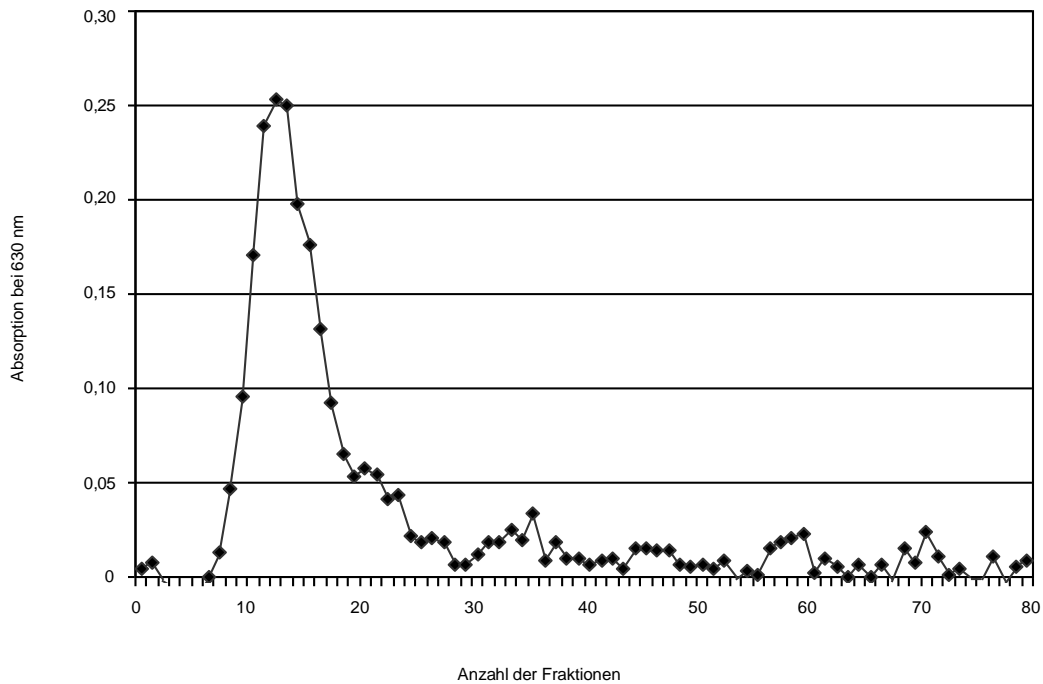
**Abbildung 4.1: Typische PEI-Standardkurve**

Es wurde eine Regressionsgerade erstellt und hierüber konnten die Konzentrationen des F25-LMW-PEIs abgelesen werden.

#### 4.1.3 Erstellung eines PEI-Elutionsprofils

Die einzelnen Konzentrationen wurden im Diagramm den nummerierten Fraktionen zugeordnet, so entstand bei Gegenüberstellung der beiden Parameter ein Elutionsprofil wie in Abb. 4.2 dargestellt. Der charakteristische 25 kDa Hauptpeak liegt zwischen den Fraktionen 12 und 22, mit einem Peak-Maximum bei Fraktion 14. Die PEI-Konzentration steigt zwischen den Fraktionen 7 und 12 stark an, der späte Abfall des Peaks zwischen den Fraktionen 18 und 27 ist im Gegensatz hierzu verlangsamt und noch auf höherem Niveau, bis er bei Fraktion 28 abfällt und die Absorption kaum noch bestimmt werden kann bzw. knapp über der Nachweisgrenze liegt.

Die PEI-Konzentrationen in den höheren Fraktionen weisen einzelne kleine Peaks auf wie z. B. um die Fraktionen 36, 59 und 71. Hier kann man aufgrund der minimalen Ausschläge und fehlender Reproduzierbarkeit in mehreren Messreihen von Verunreinigungen ausgehen.



**Abbildung 4.2:** Elutionsprofil einer Gel-Permeationschromatographie von 50 mg 25kD-PEI an Sephadex G50™ fine zur Herstellung des Low molecular weight Polyethylenimins F25-LMW-PEI

#### 4.1.4 Charakterisierung einzelner Fraktionen und Vereinigung zu F25-LMW-PEI

Nach Konzentrationsbestimmung der einzelnen Fraktionen wurden jeweils 4 Fraktionen zusammengeführt. Es folgte eine erneute Konzentrationsbestimmung der vereinigten Fraktionen, mit denen in folgenden Versuchen die Transfektionen durchgeführt wurden.

In den Versuchsreihen wurde ausschließlich das F25-LMW-PEI genutzt, welches durch Vereinigung aller Fraktionen mit guter Transfektionseffizienz entstand. Zunächst sollte die DNA-Transfektionseffizienz des F25-LMW-PEIs in mehreren Versuchen in Abhängigkeit verschiedener Parameter charakterisiert werden. Im Anschluss erfolgten die Versuche zur Überprüfung des siRNA-Knockdowns.

## 4.2 Optimierung der DNA-Transfektionseffizienz von F25-LMW-PEI

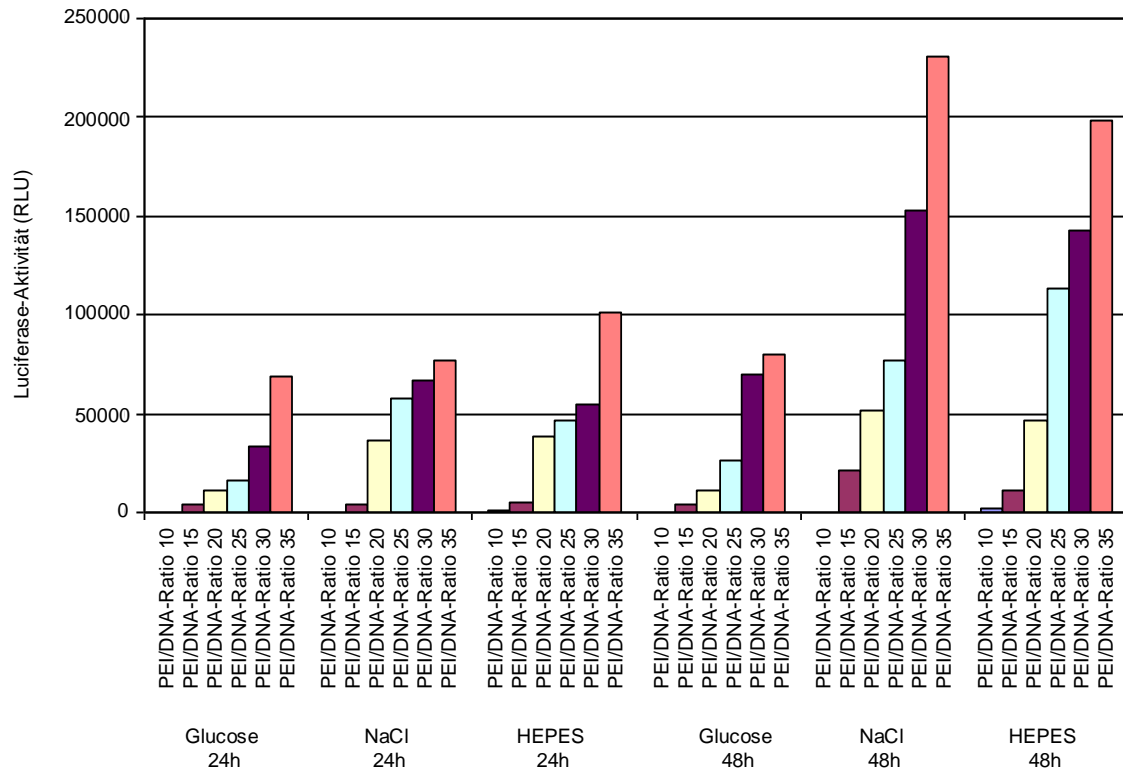
In den ersten Versuchen wurde die DNA-Transfektionseffizienz in Abhängigkeit von der PEI/DNA-Ratio und unter verschiedenen Transfektionsbedingungen untersucht.

Zur Kontrolle der Wirksamkeit von PEI-vermittelten DNA-Transfektionen wurde die Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3 verwendet. Die verwendete DNA war der Luciferase-Expressionsvektor pGl3-NFκB-DNA, so dass man die Transfektionseffizienz direkt proportional der im Luminometer gemessenen Luciferase-Aktivität (RLU) annehmen konnte. Die PEI/DNA-Ratio, bei der es sich um das Verhältnis der PEI-Menge zur DNA-Menge handelt, wurde in den Versuchen zwischen 10 und 35 variiert. Das F25-LMW-PEI sowie die DNA wurden zunächst einzeln in verschiedenen Lösungen mit 150 mM NaCl, 5% Glucose oder dem Puffer NaCl-HEPES aufgenommen und dann zur Komplexierung vereint.

Der Puffer NaCl-HEPES wurde als Alternative neben der 150 mM NaCl-Lösung verwendet. Aufgrund des erhöhten Arbeitsaufwandes für die Einstellung des pH-Wertes der 150 mM NaCl-Lösung vor jedem Versuch, wurde ein direkter Vergleich der Komplexierungsbedingungen des Puffers mit der Lösung angestrebt. Die 5% Glucose-Lösung hatte einen voreingestellten pH-Wert von 7,4.

Die Transfektionen erfolgten 1 h nach der Komplexierung (Vereinigung der Ansätze von PEI und DNA) in 2% FCS-haltigem IMDM-Medium, es erfolgte im Verlauf kein Medienwechsel.

Gemessen wurden die Luciferase-Aktivitäten zu verschiedenen Zeitpunkten bzw. nach verschiedenen Inkubationszeiten der Komplexe auf die Zellen, um eine Zeitabhängigkeit, der auf die Zellen einwirkenden Transfektionskomplexe zu beobachten.



**Abbildung 4.3:** Darstellung der DNA-Transfektionseffizienzen in Abhängigkeit von der PEI/DNA-Ratio, der Komplexbildungslösung sowie der Zeit

In der Abbildung 4.3 ist die Transfektionseffizienz in Abhängigkeit von der PEI/DNA-Ratio, der Komplexbildungslösung und der Einwirkdauer dargestellt.

Nach 24 h zeigten die Luciferase-Aktivitäten für die in den verschiedenen Ansätzen mit 5% Glucose, 150 mM NaCl oder NaCl-HEPES komplexierten Ansätze in Abhängigkeit von der Ratio steigende Luciferase-Aktivitäten bis auf ein Maximum von ca. 100.000 RLU für die in NaCl-HEPES komplexierten PEI/DNA-Ratio 35-Ansätze.

In allen Ansatzreihen zeigte sich unabhängig vom Zeitpunkt der Messung eine nahezu proportionale Zunahme der Luciferase-Aktivität mit Anstieg der PEI/DNA-Ratio von 10 auf 35. Insgesamt lagen die Absolutwerte in RLU jedoch für die in 150 mM NaCl und NaCl-HEPES gelösten Transfektionskomplexe höher als die, der in 5% Glucose-Lösung hergestellten Komplexe. Nach 48 h war dieser Effekt noch ausgeprägter und es zeigte sich für die in der 150 mM NaCl-Lösung hergestellten Komplexe der Ratio 35 eine Luciferase-Aktivität von über 230.000 RLU. Insgesamt stellte sich für die in der 150 mM NaCl-Lösung oder dem Puffer NaCl-HEPES gelösten Komplexe eine annähernd gleich gute Transfektionseffizienz dar. Die Werte der Luciferase-Aktivität, der in 5%

Glucose angefertigten Ansätze nach 48 h, lagen im Gegensatz hierzu weit darunter, waren aber mit Werten bis zu 75.000 RLU für die Ratio 35-Ansätze eindeutig nachweisbar.

### **4.3 Transiente Co-Transfektionen von DNA und siRNA**

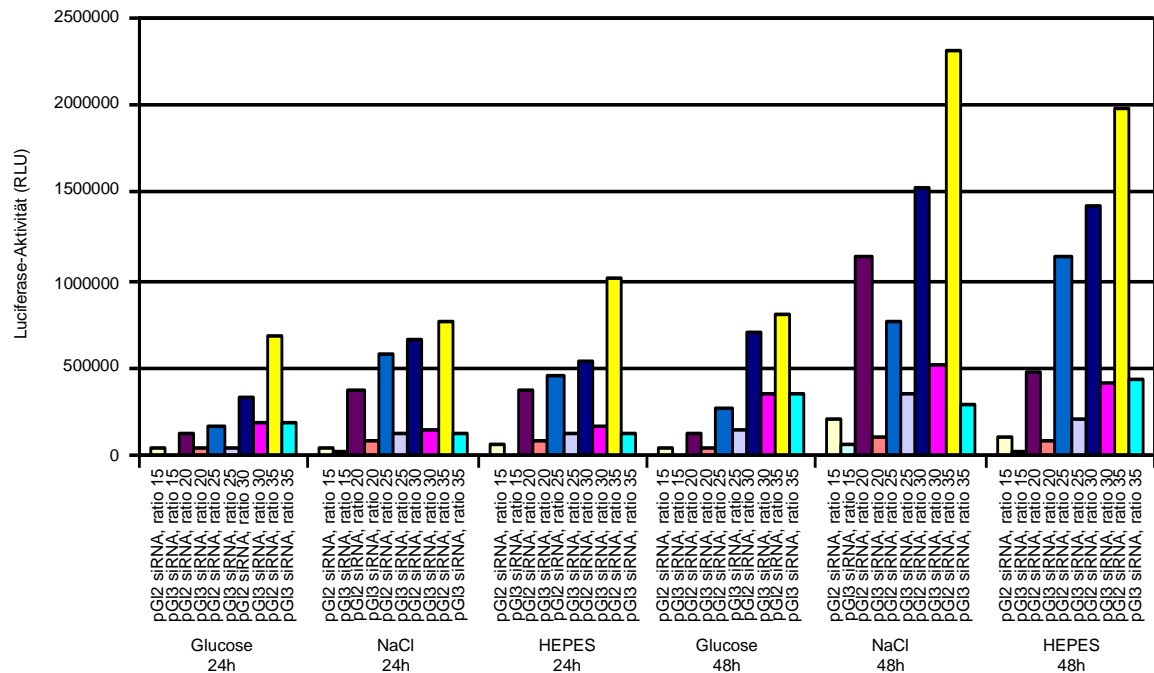
Zur Überprüfung der Wirksamkeit von PEI-vermittelten siRNA-Transfektionen und dem damit verbundenen siRNA-Knockdown wurden ebenfalls SKOV3-Zellen verwendet. Es wurde die gleiche Menge an Luciferase exprimierender pGI3-NFkB-DNA und der spezifisch gegen die Luciferase-mRNA gerichteten pGL3-siRNA verwendet. Als Negativ-Kontrolle für den Luciferase-Knockdown diente die unspezifische pGI2-siRNA.

Untersucht wurden analog zu den in 4.2 dargestellten Versuchen zur DNA-Transfektionseffizienz die optimalen Bedingungen für die Transfektion mit PEI/siRNA/DNA-Komplexen. Entsprechend wurden verschiedene PEI/siRNA/DNA-Ratios verwendet, um eine möglichst hohe Effizienz zu ermitteln. Hierbei handelt es sich um das Verhältnis der PEI-Menge zur DNA- und siRNA-Menge. Da in den DNA-Transfektionsversuchen, wie in Abb. 4.3 dargestellt, für Ratio 10 keine Luciferase-Expression messbar war, wurden bei den Co-Transfektionen die PEI/siRNA/DNA-Ratios 15-35 untersucht.

Die Komplektierungen erfolgten in einer 150 mM NaCl- oder einer 5% Glucose-Lösung und in dem Puffer NaCl-HEPES. Die Transfektion der SKOV3-Zellen in 2% FCS-haltigem IMDM-Medium erfolgte 1 h nach Komplektierung, ein Medienwechsel fand nicht statt. Die Messungen der Luciferase-Aktivitäten wurden nach 24 h und 48 h zur Darstellung einer evtl. Zeitabhängigkeit durchgeführt.

Beispielhaft für die Absolutwerte wurde die Abbildung einer Transfektion ausgesucht, da die Absolutwerte zwischen unterschiedlichen Experimenten aufgrund der Zelldichte divergierten.





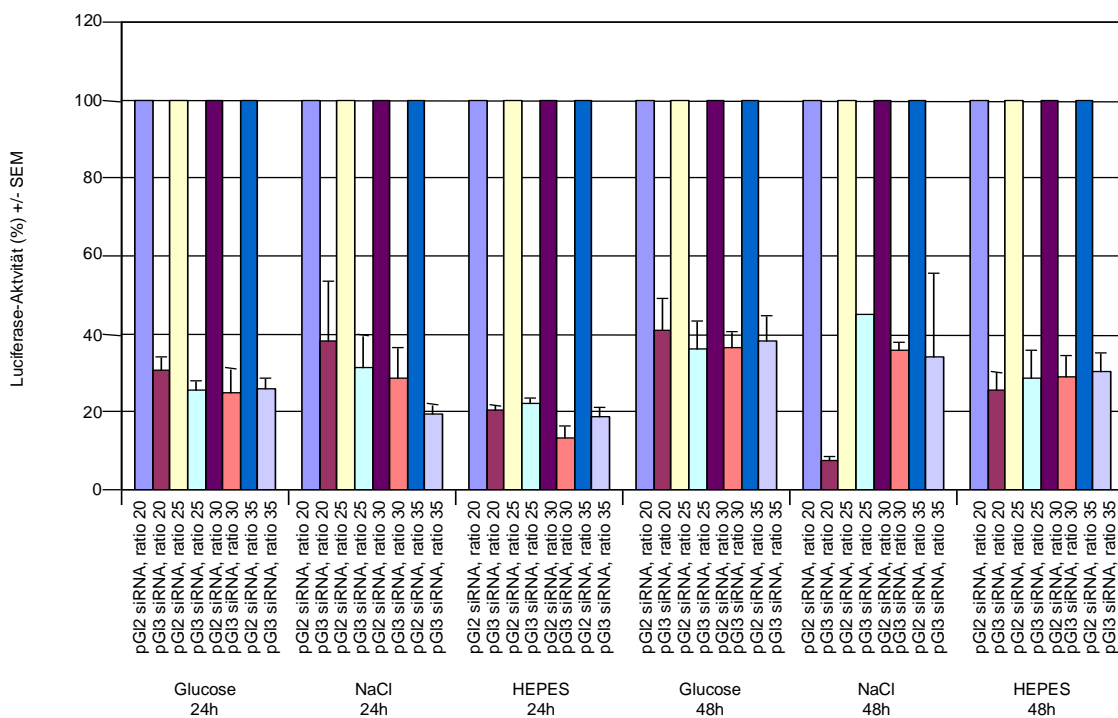
**Abbildung 4.4:** Vergleich der Luciferase-Aktivitäten in SKOV3-Zellen und des PEI/siRNA-vermittelten Gentargetings in Abhängigkeit von der PEI/siRNA/DNA-Ratio und der verwendeten Lösung mit 5% Glucose, 150mM NaCl oder dem Puffer NaCl-HEPES nach 24 h und 48 h

Nach 24 h war die DNA-Transfektion (hier gleichzusetzen mit den Zellen, die mit der DNA und der unspezifischen siRNA pG12 transfiziert wurden) schon gut nachweisbar. Es zeigte sich eine proportionale Zunahme der DNA-Transfektionseffizienz mit Zunahme der Ratio analog der in Kapitel 4.2 dargestellten Ergebnisse. Ebenfalls war die DNA-Transfektionseffizienz abhängig von der verwendeten Lösung bzw. dem Puffer. Sowohl nach 24 h als auch nach 48 h waren die Luciferase-Aktivitäten am stärksten ausgeprägt bei den Zellen, die mit den in 150 mM NaCl komplexierten Ansätzen transfiziert worden waren.

Der siRNA-Knockdown, der durch die Herunterregulation der Luciferase-Aktivität bei den mit der DNA und der spezifischen pG13-siRNA behandelten Zellen dargestellt wurde, war aufgrund der höheren Absolutwerte der Luciferase-Aktivitäten bei den in 150 mM NaCl- und NaCl-HEPES komplexierten Ansätzen besser nachweisbar als bei den in Glucose komplexierten Ansätzen.

Nach 48 h waren die DNA-Transfektionseffizienz aufgrund der höheren Luciferase-Expression sowie der siRNA-Knockdown durch Reduktion der Luciferase-Aktivitäten (bei höheren Absolutwerten) noch eindeutiger nachweisbar als nach 24 h.

Zur verbesserten Darstellung der Effizienz der Herunterregulation der Luciferase-Aktivität und des siRNA-Knockdowns wurden mehrere Ergebnisse zusammengefasst und deren Absolutwerte normiert. So stellten die mit der unspezifischen siRNA pGI2 behandelten Zellen die Vergleichsgruppe dar und wurden gleich 100% gesetzt. Die Herunterregulation der Luciferase-Aktivitäten durch den siRNA-Knockdown wurde hieran bemessen. Ebenfalls wurden nachfolgend in Abb. 4.5 die Komplexierungsbedingungen in 5% Glucose, 150 mM NaCl und in dem Puffer NaCl-HEPES gegenüber gestellt und die Ratios 20, 25, 30 und 35 verglichen.



**Abbildung 4.5:** Darstellung des PEI/siRNA-vermittelten Gentergetings in Abhängigkeit von der PEI/siRNA/DNA-Ratio und der verwendeten Lösung mit 5% Glucose, 150 mM NaCl oder dem Puffer NaCl-HEPES nach 24 h und 48 h in SKOV3-Zellen

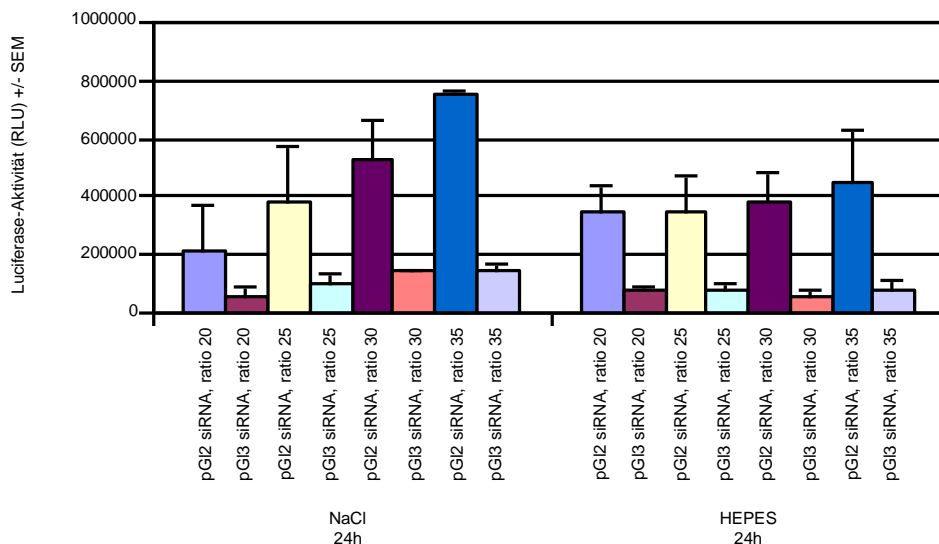
Betrachtet man in Abb. 4.5 die Herunterregulation der Luciferase-Aktivitäten durch siRNA-Knockdown unabhängig von den gemessenen Absolutwerten der Luciferase-Aktivität, erkennt man, dass die Herunterregulation bei den in der 150 mM NaCl-Lösung und den in dem Puffer NaCl-HEPES komplexierten Ansätzen, besser nachzuweisen war als bei den in 5% Glucose komplexierten Ansätzen. Dieses galt besonders für die nach 48 h durchgeführten Transfektionen.

Der Effekt der Herunterregulation war nach 24 h und 48 h bei allen Ansätzen eindeutig nachweisbar und es erfolgten Reduktionen der Luciferase-Aktivitäten auf Werte bis 15% im Vergleich zu den mit der unspezifischen siRNA behandelten Zellen.

Die aufgeführten SEM (Standard error of the mean) der normierten Werte zeigen, dass zwischen den einzelnen nach gleichen Bedingungen durchgeführten Versuchen die Abweichungen der einzelnen Messungen gering waren.

#### 4.3.1 Direkter Vergleich der Komplexierungsbedingungen in 150 mM NaCl oder dem Puffer NaCl-HEPES

Ein Vergleich der DNA-Transfektionseffizienzen und dem siRNA-vermittelten Knockdown nach Komplexierung in 150 mM NaCl oder dem Puffer NaCl-HEPES wurde nach 24 h dargestellt, um zu zeigen, dass sowohl 150 mM NaCl als auch der Puffer gleichwertig zur DNA-Transfektion und zum siRNA-vermitteltem Knockdown eingesetzt werden können.



**Abbildung 4.6: Vergleich der Luciferase-Aktivitäten und des siRNA-vermittelten Knockdowns in SKOV3-Zellen in Abhängigkeit von der PEI/siRNA/DNA-Ratio und der verwendeten 150 mM NaCl-Lösung oder dem Puffer NaCl-HEPES nach 24 h**

Die in NaCl komplexierten Ansätze zeigten eine mit der PEI/siRNA/DNA-Ratio von 20 bis 35 ansteigende DNA-Transfektionseffizienz in Bezug auf die

Absolutwerte (Werte für unspezifische siRNA pGI2). Für die in dem Puffer NaCl-HEPES komplexierten Ansätze waren die Absolutwerte für die mit der unspezifischen siRNA behandelten Zellen weniger abhängig von der PEI/siRNA/DNA-Ratio und stiegen insgesamt von 350.000 auf 420.000 RLU.

Die Herunterregulation der Luciferase-Expression durch Einsatz der spezifischen siRNA pGI3 war unter beiden Komplexierungsbedingungen nachweisbar. Aufgrund des direkten Vergleichs und Darstellung eines fast gleichwertigen siRNA-Knockdowns wurde in verschiedenen folgenden Versuchen als Komplexierungslösung der Puffer NaCl-HEPES verwendet.

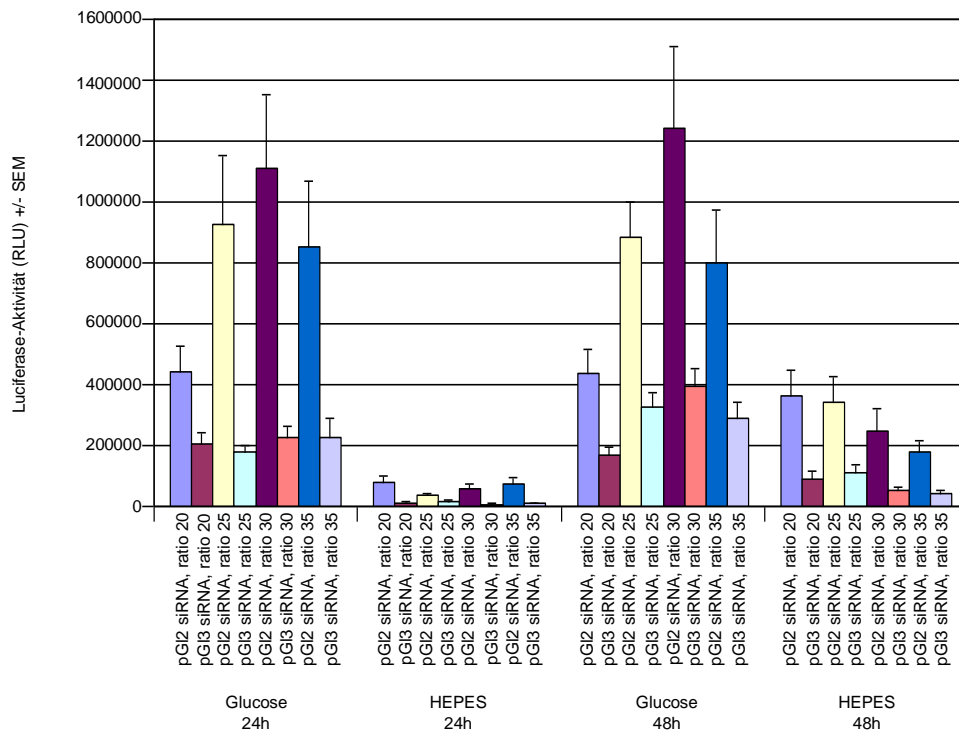
#### **4.4 DNA-Transfektionseffizienz und Effizienz des siRNA-Knockdowns nach Lyophilisierung**

Die Transfektionen wurden nach dem Protokoll durchgeführt wie die unter 4.3 beschriebenen transienten Co-Transfektionen. Es wurden die Komplexierungsbedingungen in der 5% Glucose-Lösung und dem Puffer NaCl-HEPES sowie die Ratios 20, 25, 30 und 35 verglichen.

Die Lyophilisierung der hergestellten Komplexe diente zur Untersuchung der möglichen Kryokonservierung von PEI-Oligonukleotidkomplexen und zur Überprüfung des möglichen siRNA-Knockdowns. Nach abgeschlossener Lyophilisierung über Nacht wurden die in Eppendorfgefäßen lyophilisierten Ansätze in der entsprechenden Menge der 5% Glucose-Lösung oder des Puffers NaCl-HEPES aufgenommen. Es wurde genau das Volumen an Lösung oder Puffer wieder hinzugeführt, welches vor der Lyophilisierung als Komplexlösung in die Eppendorfgefäße gegeben worden war. Danach wurden die Ansätze auf die in den 24-Well-Platten ausgesäten 60.000 SKOV3-Zellen/Well in 2% FCS-haltiges IMDM-Medium pipettiert und die Transfektion durchgeführt. Nach 4 h erfolgte ein Medienwechsel mit 10% FCS-haltigem IMDM-Medium.

Es wurden mehrere gleich aufgebaute Transfektionen durchgeführt und die Ergebnisse zusammengefasst. In diesen Versuchen konnte man die Absolutwerte gut vergleichen, die in mehreren hintereinander durchgeführten

Versuchen für die unterschiedlichen Bedingungen konstante Ergebnisse aufwiesen.



**Abbildung 4.7:** Vergleich der Luciferase-Aktivität und des siRNA-vermittelten Knockdowns in SKOV3-Zellen in Abhängigkeit von der PEI/siRNA/DNA-Ratio und des verwendeten Solvens Glucose oder NaCl-HEPES nach 24 h und 48 h und nach vorheriger Lyophilisierung

Im Gegensatz zu den mit den frischen Komplexen durchgeführten Transfektionen wurden für die in 5% Glucose zubereiteten Komplexe nach Lyophilisierung und anschließender Rehydratation in Glucose höhere Absolutwerte als für die in dem Puffer NaCl-HEPES gelösten Komplexe, sowohl nach 24 h als auch nach 48 h, erreicht.

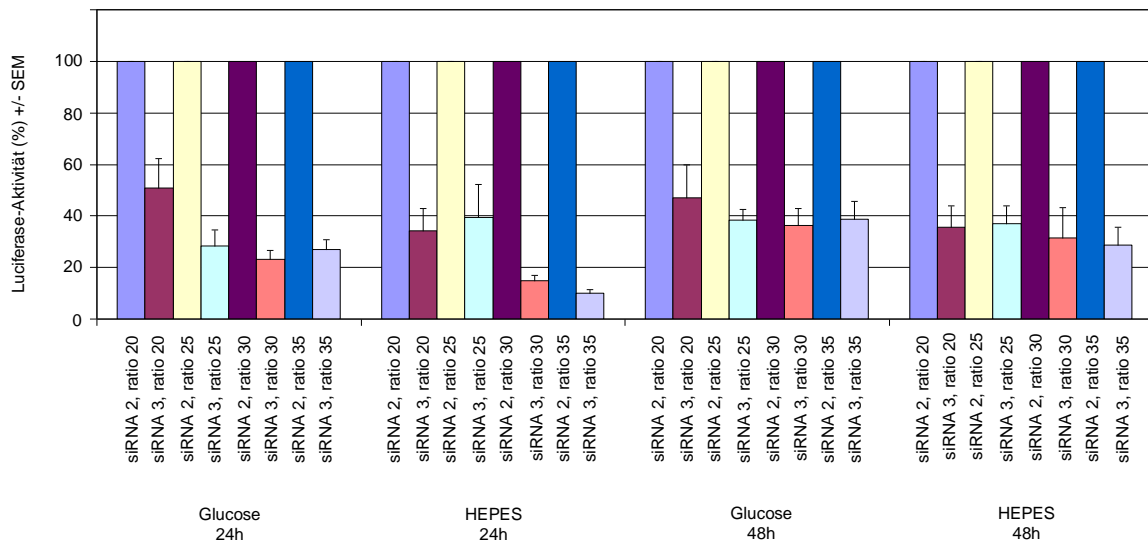
Nach 24 h zeigten sich für die im PEI/siRNA/DNA-Verhältnis 30 mit der unspezifischen pG12-siRNA behandelten Zellen hohe Absolutwerte mit ca. 1.100.000 RLU. Nach 48 h lag bei den in 5% Glucose komplexierten Ansätzen das Maximum an RLU bei ca. 1.250.000, auch hier bei dem PEI/siRNA/DNA-Verhältnis von 30. Die Herunterregulation der Luciferase-Expression durch den Einsatz der pG13-siRNA war nach 24 h und 48 h ausgeprägt, ein direkter Vergleich der Effizienz des siRNA-Knockdowns ist jedoch nach Normierung, wie in Abb. 4.8 gezeigt, besser möglich.

Die im Puffer NaCl-HEPES komplexierten und resolubilisierten Ansätze erreichten nach 48 h lediglich Maximalwerte von ca. 390.000 RLU für die mit

dem Ratio 20-Ansatz transfizierten Zellen. Auffällig war bei Betrachtung der Werte nach 48 h, dass im Gegensatz zu den Ergebnissen der mit den frischen Komplexen durchgeführten Transfektionen, die DNA-Transfektionseffizienz disproportional zum PEI/siRNA/DNA-Verhältnis erschien: Mit Zunahme der Ratio nahm die Luciferase-Expression ab (vgl. Absolutwerte, der mit der pGL2-siRNA behandelten Zellen nach 48 h).

Zum Nachweis der Herunterregulation der Luciferase-Aktivität durch PEI/siRNA-vermitteltes Gentargeting wurden die in der Abb. 4.7 dargestellten Versuchswerte normiert und die Werte der mit der unspezifischen siRNA pGL2 behandelten Zellen gleich 100% gesetzt. Diese Werte entsprachen der DNA-Transfektionseffizienz für eine bestimmte PEI/siRNA/DNA-Ratio in Abhängigkeit von Lösung oder Puffer und Zeit.

Die Herunterregulation durch den siRNA-vermittelten Knockdown konnte hierzu ins Verhältnis gestellt werden und die Reduktion der Luciferase-Aktivitäten zu bestimmten Zeitpunkten in Abhängigkeit von der Ratio direkt verglichen werden.



**Abbildung 4.8:** Vergleich der Transfektionseffizienz in SKOV3-Zellen in Abhängigkeit von der Ratio und der verwendeten Lösung von 5% Glucose oder dem Puffer NaCl-HEPES nach Lyophilisierung der Komplexe

Es zeigten sich sowohl für die 5% Glucose-Lösung als auch für den Puffer NaCl-HEPES eine konstante Herunterregulation der Luciferase-Aktivität durch PEI/siRNA-Gentargeting nach 24 h und nach 48 h.

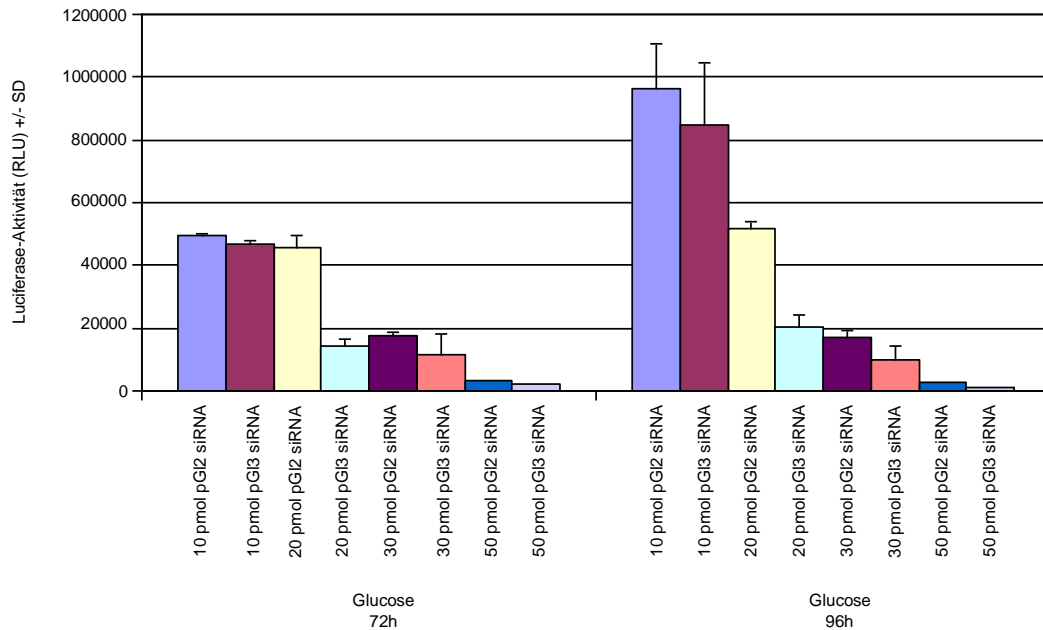
Für die in 5% Glucose komplexierten Ansätze wurde eine maximale Luciferase-Aktivitäts-Reduktion um ca. 80% nach 24 h bei den Ratio 30-Ansätzen erreicht. Im Vergleich lagen hier auch die Absolutwerte auf einem hohen Niveau, wie in Abb. 4.7 ersichtlich. Weitere Herunterregulationen nach 24 h lagen zwischen 50 - 75%. Nach 48 h wurde eine Reduktion der Luciferase-Expression für die in 5% Glucose hergestellten Komplexe um 60% unabhängig von der verwendeten PEI/siRNA/DNA-Ratio dargestellt.

Die in dem Puffer NaCl-HEPES komplexierten Ansätze zeigten hinsichtlich des PEI/siRNA-vermittelten Gentargetings vor allem nach 24 h für die mit den Ansätzen der PEI/siRNA/DNA-Ratios 30 und 35 transfizierten Zellen eine Herunterregulation um fast 90%. Nach 48 h waren die Ergebnisse beider Komplexierungsbedingungen ähnlich.

#### **4.5 Vergleich der Transfektionsbedingungen bei stabil Luciferase-exprimierenden SKOV3-10-Zellen**

Untersucht wurde das PEI/siRNA-vermittelte Gentargeting an den Luciferase-exprimierenden Zellen SKOV3-10, die eine stabile Luciferase-Aktivität aufwiesen. Die Herunterregulation der Luciferase-Aktivität entsprach einem Gentargeting bzw. einem siRNA-Knockdown.

Die Zellen wurden mit in 5% Glucose-Lösung hergestellten Ansätzen behandelt, das N/P-Verhältnis war konstant und es wurde eine PEI/siRNA/DNA-Ratio von 20 ausgewählt. Zusätzlich zur entweder spezifischen siRNA pGI3 oder der unspezifischen siRNA pGI2 wurde das DNA-Plasmid pRc-CMV transfiziert. Variiert wurden die Mengen von siRNA und DNA (in pmol) bei gleich bleibender Ratio 20 mit PEI. Beobachtet wurden in diesem Versuch die späteren Zeitpunkte nach 72 h und 96 h.

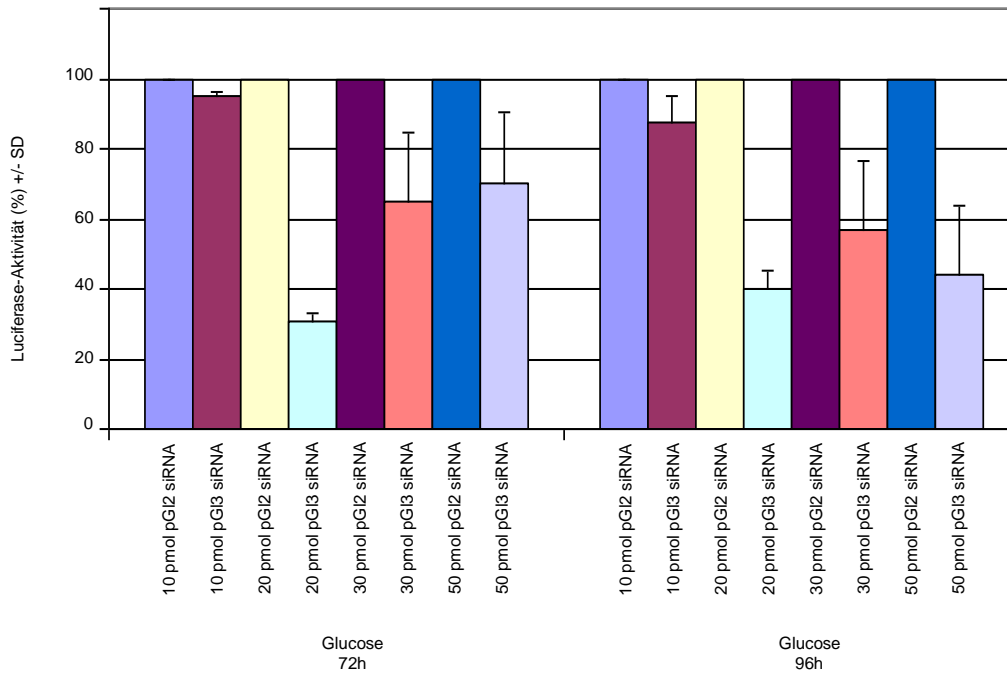


**Abbildung 4.9:** Vergleich der Luciferase-Aktivitäten und des siRNA-vermittelten Knockdowns in SKOV3-10-Zellen in Abhängigkeit der verwendeten siRNA/DNA/PEI-Menge nach 72 h und 96 h in 5% Glucose

Die Zunahme der Luciferase-Aktivität auf höhere Absolutwerte in RLU nach längerer Einwirkdauer bei den stabil Luciferase-exprimierenden Zellen ist durch das Wachstum und die Ausbreitung der Zelldichte in den Wells in Abhängigkeit von der Wachstumsdauer zu erklären.

Betrachtet man die Luciferase-Aktivitäten zu beiden Zeitpunkten, so ist auffallend, dass die RLU mit zunehmendem Anstieg der siRNA/DNA/PEI-Menge insgesamt sinken. Die höchsten Absolutwerte wurden also bei den mit 10 pmol siRNA und DNA behandelten Ansätzen detektiert. Dieser Effekt ist auf die im Verhältnis zur siRNA/DNA-Menge ansteigende PEI-Menge bei konstanter Ratio 20 zurückzuführen, da Polyethylenimine in hohen Konzentrationen zytotoxisch wirken.



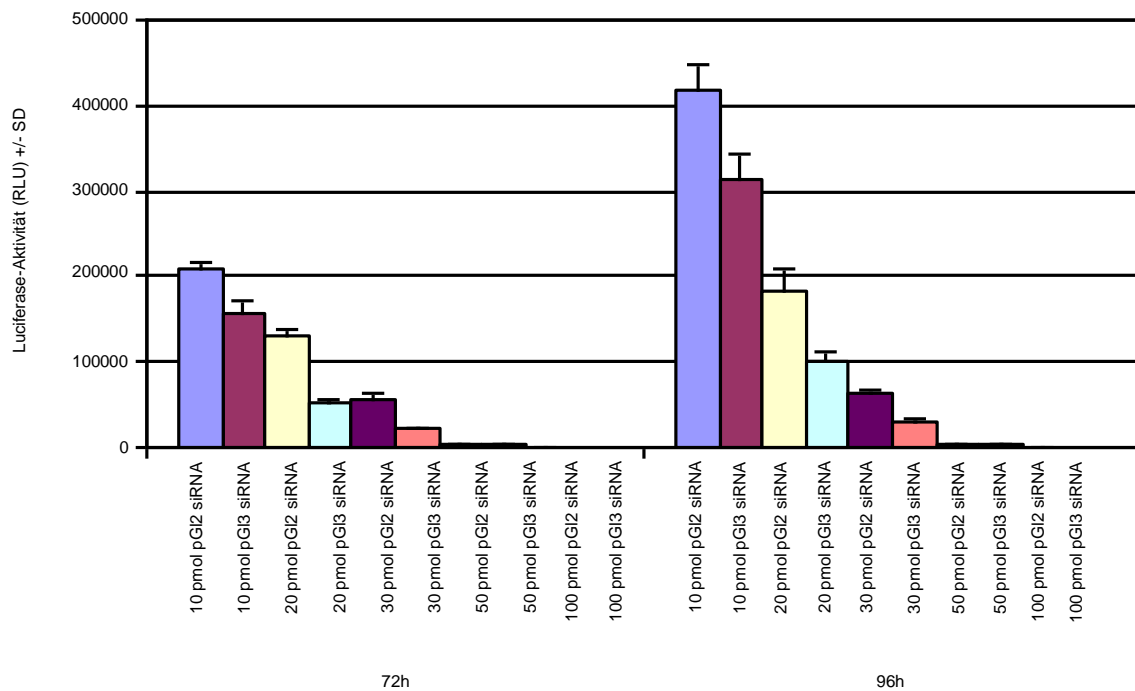


**Abbildung 4.10: Vergleich der Transfektionseffizienz in SKOV3-10-Zellen in Abhängigkeit der verwendeten siRNA/DNA/PEI-Menge nach 72 h und 96 h in 5% Glucose**

Betrachtet man in Abb. 4.10 die normierten Werte, so kann man sehen, dass die Herunterregulation der Luciferase-Aktivität erst bei der Verwendung einer siRNA/DNA-Menge ab 20 pmol stattfindet. Das Maximum der Herunterregulation und damit ein positiver Nachweis eines PEI/siRNA-vermittelten Gentargetings liegt nach 72 h für die mit den 20 pmol siRNA/DNA behandelten Ansätze vor. Nach 96 h war die Herunterregulation der Luciferase-Aktivität für die Ansätze mit 50 pmol siRNA/DNA auf 43% vergleichbar mit der des 20 pmol Ansatzes auf ca. 39%.

#### 4.6 Vergleich der Transfektionsbedingungen bei stabil Luciferase-exprimierenden SKOV3-10-Zellen nach Lyophilisierung

Die wie unter 4.5 beschrieben hergestellten Transfektions-Ansätze wurden über Nacht lyophilisiert und anschließend in der entsprechenden Menge 5% Glucose-Lösung resolubilisiert. Es wurden die siRNA/DNA-Mengen von 10, 20, 30, 50 und 100 pmol bei einer konstanten PEI/siRNA/DNA-Ratio von 20 verwendet. Auch hier wurde das DNA-Plasmid pRc-CMV zusätzlich transfiziert. Die Messungen erfolgten nach 72 h und 96 h.

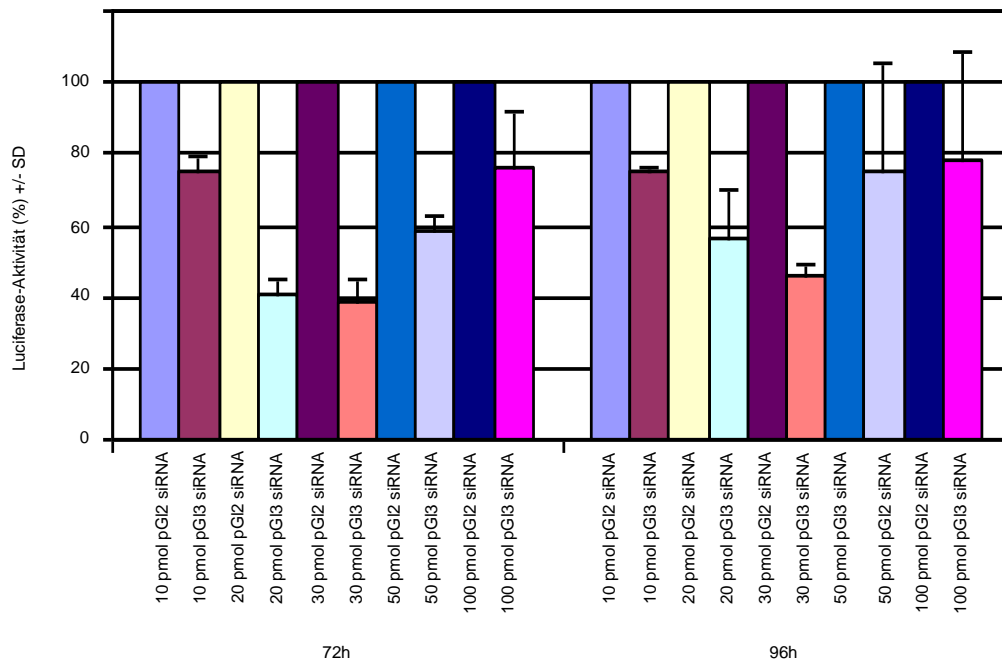


**Abbildung 4.11: Vergleich der Luciferase-Aktivitäten in SKOV3-10-Zellen in Abhängigkeit der verwendeten siRNA/DNA/PEI-Menge 72 h und 96 h nach Transfektion sowie Aufnahme der lyophilisierten Komplexe in 5% Glucose**

Bei Betrachtung der Abb. 4.11 ist deutlich, dass die Luciferase-Aktivität nach weiteren 24 h Wachstumsdauer und entsprechender Zellvermehrung der stabil Luciferase-exprimierenden SKOV3-10-Zellen weiter ansteigt. Es zeigten sich insgesamt höhere RLU (Absolutwerte) nach 96 h als nach 72 h.

Die Absolutwerte der Luciferase-Aktivität sanken entsprechend den unter 4.5 aufgeführten Ergebnissen mit ansteigender siRNA/DNA-Menge und damit auch steigender PEI-Menge. Bei den siRNA/DNA-Mengen von 50 und 100 pmol waren kaum noch Luciferase-Aktivitäten nachweisbar, welches durch die zunehmende Zytotoxizität bei steigenden PEI-Mengen erklärbar ist.

Zur verbesserten Darstellung des PEI/siRNA-vermittelten Knockdowns durch Herunterregulation der Luciferase-Aktivität wurden die in der Abb. 4.11 gezeigten Versuchswerte wie zuvor normiert. Die Werte der mit der unspezifischen siRNA pG12 behandelten Zellen entsprachen der natürlichen Luciferase-Expression der stabil exprimierenden SKOV3-10-Zellen. Die Herunterregulation durch den siRNA-vermittelten Knockdown konnte hierzu ins Verhältnis gestellt und die Reduktion der Luciferase-Aktivitäten zu bestimmten Zeitpunkten in Abhängigkeit von der siRNA/DNA- bzw. der PEI-Menge bei konstanter Ratio 20 direkt verglichen werden.



**Abbildung 4.12: Darstellung des PEI/siRNA-vermittelten Knockdowns der Luciferase-Aktivität in SKOV3-10-Zellen in Abhängigkeit von der verwendeten siRNA/DNA/PEI-Menge nach 72 h und 96 h in 5% Glucose nach Lyophilisierung**

Betrachtet man Abb. 4.12, so ist auch für die nach der Lyophilisierung transfizierten Zellen eine Herunterregulation von mehr als 50% bei den 20 pmol und 30 pmol siRNA/DNA-Ansätzen zu erkennen. Die Reduktion der Luciferase-Expression ist zu dem früheren Zeitpunkt bei allen Ansätzen deutlicher nachweisbar. Bei Verwendung einer geringeren siRNA/DNA-Menge kann eine Herunterregulation auf bis ca. 75% erreicht werden.

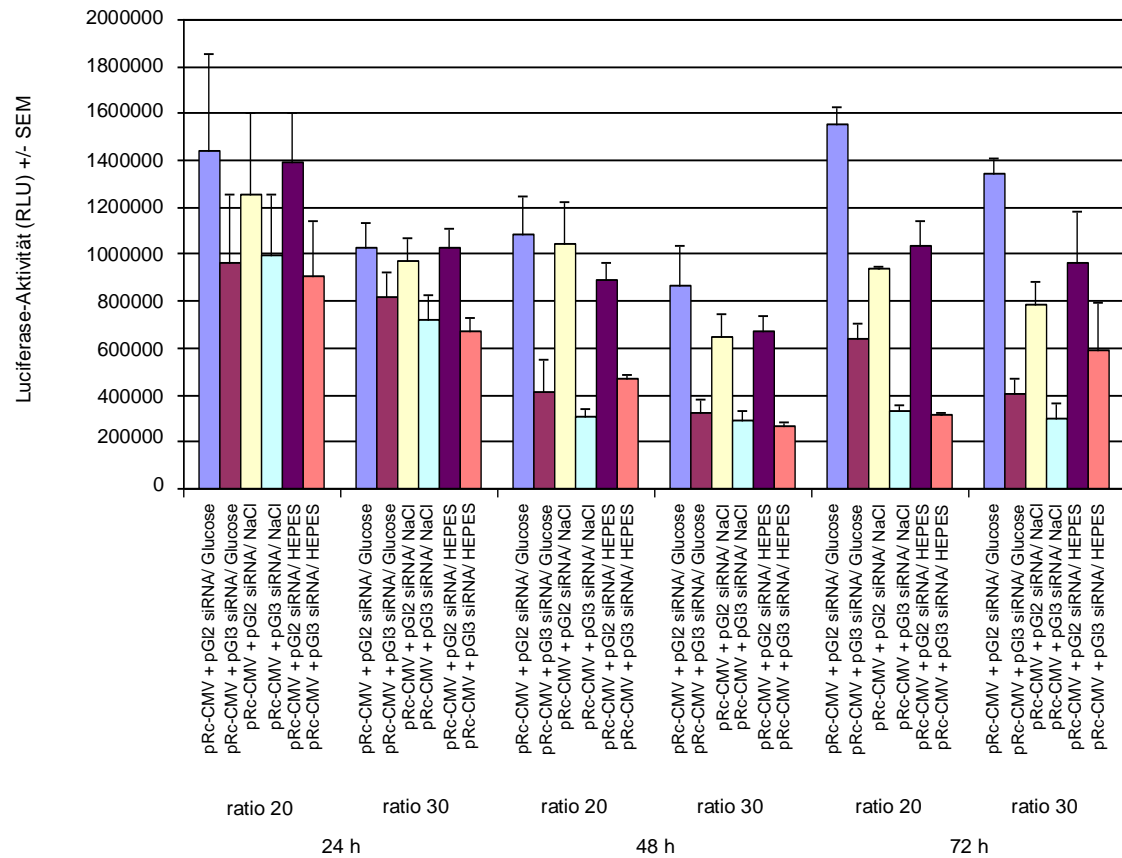
Die Werte für die Ansätze mit 50 und 100 pmol siRNA/DNA sind, wie man an den Standardabweichungen sehen kann, aufgrund der unterschiedlichen und nur sehr kleinen absoluten Zahlen der RLU nur eingeschränkt verwertbar.

Aufgrund der ansteigenden Zytotoxizität bei konstanter Ratio und steigender PEI-Menge mit Verwendung von mehr als 30 pmol siRNA/DNA, wurde in allen folgenden Versuchen mit stabil transfizierten, Luciferase-exprimierenden SKOV3-10-Zellen mit einer Menge von 20 pmol siRNA/DNA gearbeitet. Variiert wurde jedoch folgend die PEI/siRNA/DNA-Ratio.

#### **4.7 Vergleich des PEI/siRNA-vermittelten Knockdowns in Abhängigkeit von Ratio, Lösung und Puffer**

Bislang waren die Versuche mit den stabil Luciferase-exprimierenden SKOV3-10-Zellen mit einer PEI/siRNA/DNA-Ratio von 20 durchgeführt worden. In diesem Versuch sollte die Herunterregulation der Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit von der Ratio bzw. dem N/P-Verhältnis untersucht werden. Die PEI/siRNA/DNA-Ratio bei Verwendung von frischen, nicht lyophilisierten Komplexen war in vorherigen Versuchen (unveröffentlichtes Material) schon auf Werte zwischen 20 und 30 eingegrenzt worden, so dass hier diese beiden Ratios direkt gegenüber gestellt werden sollten.

In beiden Ansätzen wurden 20 pmol siRNA (pGI2 oder pGI3) und DNA (pRc-CMV) angewendet, PEI wurde im entsprechenden Verhältnis 20 bzw. 30 zugesetzt. Die Komplektierungen erfolgten in 5% Glucose-, in 150 mM NaCl-Lösung bzw. dem Puffer NaCl-HEPES. Die Transfektionen erfolgten in 2% FCS-haltigem IMDM-Medium, ein Medienwechsel erfolgte nach 24 h.



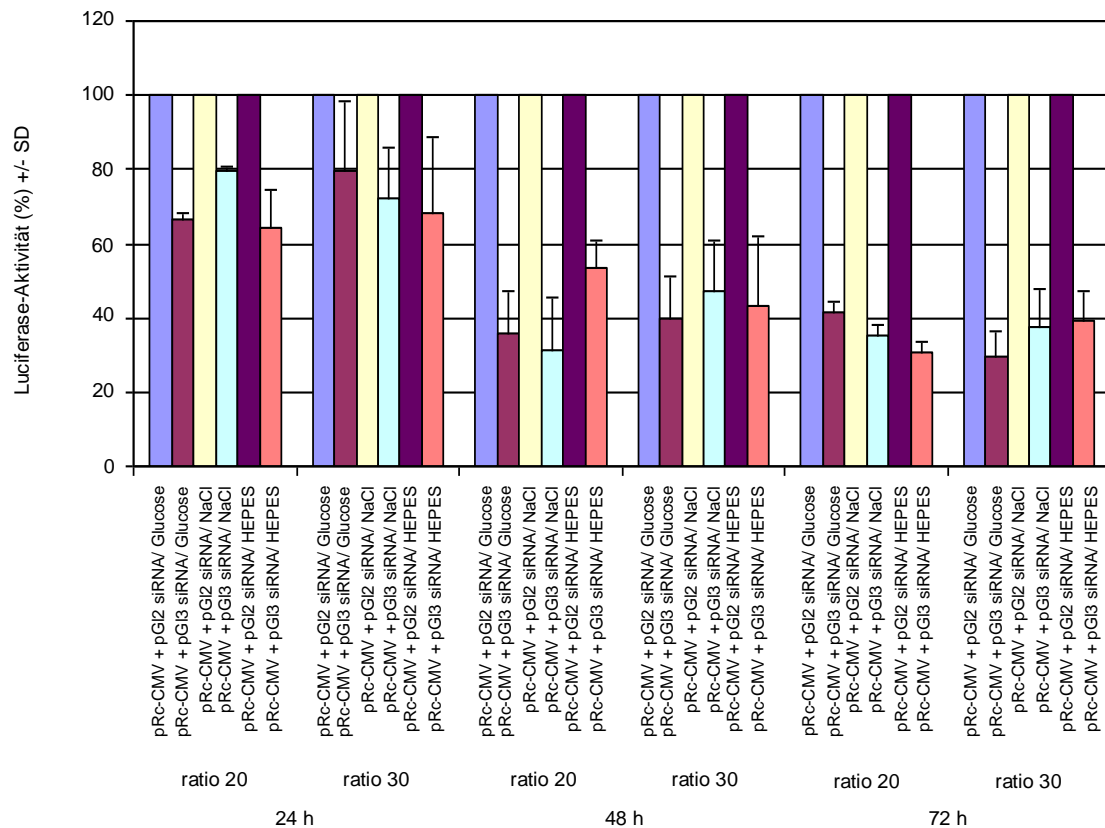
**Abbildung 4.13:** Vergleich der Luciferase-Aktivitäten in SKOV3-10-Zellen in Abhängigkeit der verwendeten Ratio 20 bzw. 30 in 5% Glucose, 150 mM NaCl oder dem Puffer NaCl-HEPES, nach 24 h, 48 h und 72 h

Vergleicht man die Absolutwerte der gemessenen Luciferase-Aktivitäten miteinander, so kann man erkennen, dass diese für die mit der PEI/siRNA/DNA-Ratio 20 behandelten Zellen insgesamt etwas höher liegen als für die mit der PEI/siRNA/DNA-Ratio 30 behandelten Zellen, was am ehesten auf die Toxizität des PEIs in höheren Dosen zurückzuführen ist.

Die SKOV3-10-Zellen, bei denen die in 5% Glucose komplexierten Ansätze genutzt wurden, weisen die höheren Absolutwerte auf. Eine Erhöhung der Luciferase-Aktivität mit zunehmender Wachstumsdauer der Zellen ist im Gegensatz zu den unter 4.4 und 4.6 aufgeführten Versuchen nicht zu erkennen. Die hohen Standardfehler SEM (Standard error of the mean) bei dem Vergleich der absoluten Werte sind auf ein Zusammenfassen mehrerer Versuche zurückzuführen, bei denen die einzelnen Messwerte aufgrund der Zelldichte schwankten.

Ein PEI/siRNA-vermittelter Knockdown ist eindeutig bei allen verwendeten Puffern, den verschiedenen Ratios und nach 24, 48 und 72 h zu erkennen.

Dieses wird in der nachfolgenden Abb. 4.14, in der eine Normierung vorgenommen wurde, nochmals deutlicher.



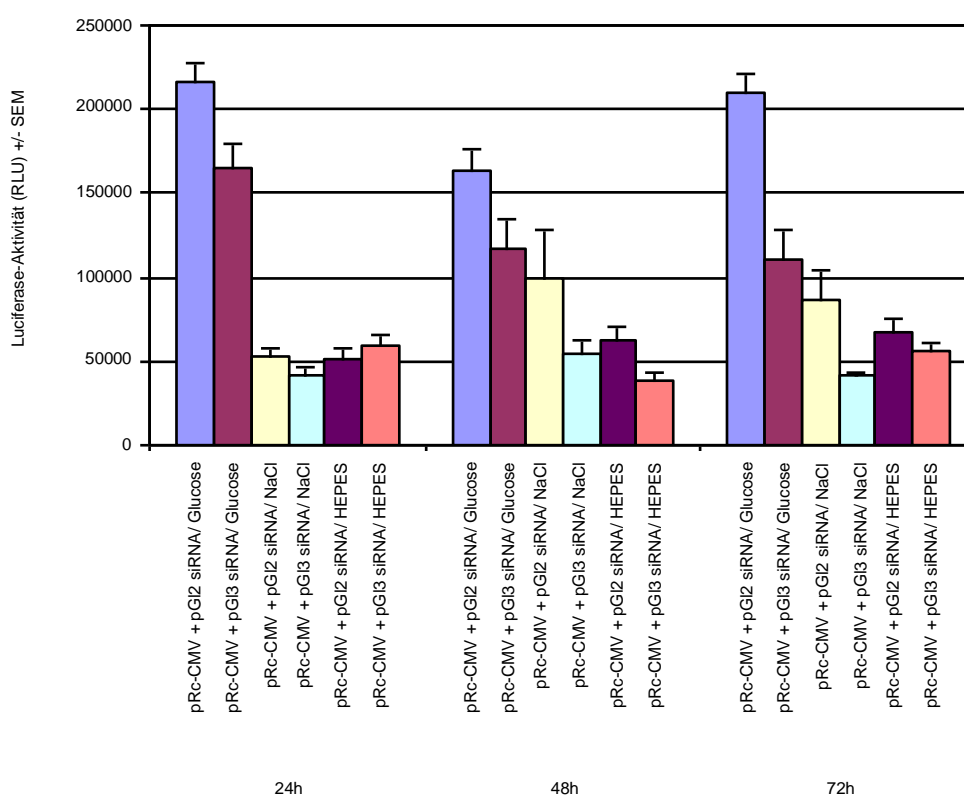
**Abbildung 4.14: Vergleich der Transfektionseffizienz in SKOV3-10-Zellen in Abhängigkeit der verwendeten Ratio 20 bzw. 30 in 5% Glucose, 150 mM NaCl oder dem Puffer NaCl-HEPES, nach 24 h, 48 h und 72 h**

Betrachtet man die normierten Werte, fällt auf, dass der siRNA-Knockdown und die Herunterregulation der Luciferase-Aktivität abhängig von der Zeit ist und nach 72 h zwischen 60% und 70% beträgt.

Bei beiden verwendeten PEI/siRNA/DNA-Ratios ist die Herunterregulation der Luciferase an den drei Zeitpunkten in 5% Glucose, 150 mM NaCl und in dem Puffer NaCl-HEPES eindeutig nachweisbar und scheint unabhängig von der Ratio zu sein.

#### 4.8 Vergleich des PEI/siRNA-vermittelten Knockdowns in Abhängigkeit vom Puffer nach Lyophilisierung

In diesem Vergleich wurden die Ansätze wie unter 4.7 beschrieben hergestellt, es wurde die Kryokonservierungsmöglichkeit bei den Ansätzen der PEI/siRNA/DNA-Ratio von 30 untersucht. Die Lyophilisierung erfolgte über Nacht, die lyophilisierten Komplexe wurden in genau der Menge resolubilisiert, in der sie auch angesetzt worden waren. Die Transfektion erfolgte in 2% FCS-haltigem IMDM-Medium, ein Medienwechsel erfolgte nach 24 h.

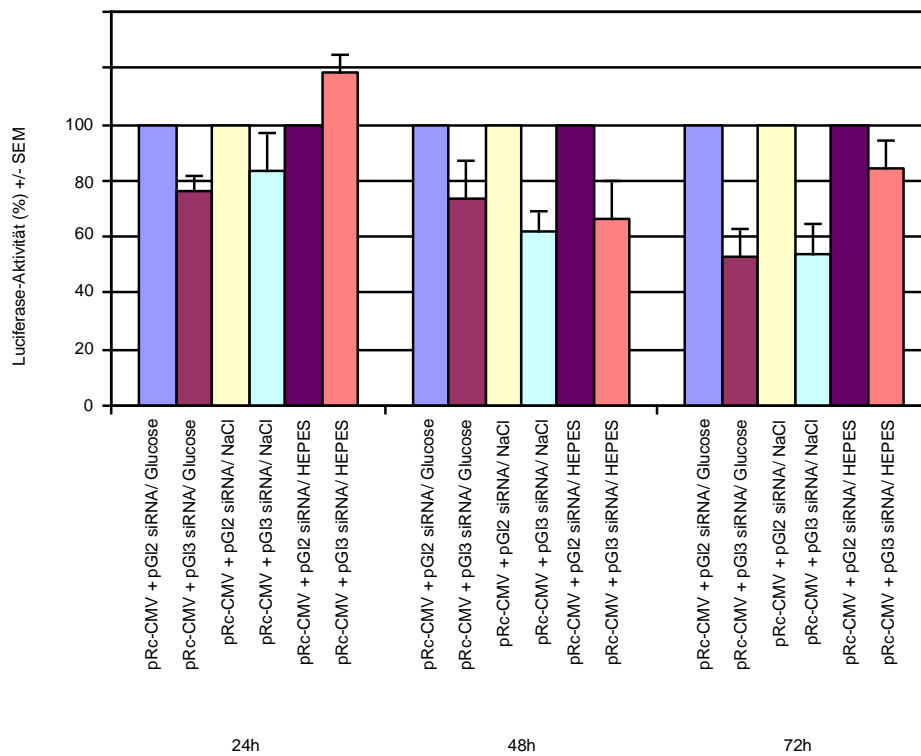


**Abbildung 4.15:** Vergleich der Luciferase-Aktivitäten in SKOV3-10-Zellen bei Verwendung eines Ratio 30-Ansatzes nach 24 h, 48 h und 72 h in 5% Glucose, 150 mM NaCl oder dem Puffer NaCl-HEPES, nach Lyophilisierung

Die Zellen, die mit dem lyophilisierten Ratio 30-Transfektionsansatz behandelt wurden, zeigten nach 24, 48 und 72 h nur für die in 5% Glucose hergestellten Ansätze hohe Absolutwerte der Luciferase-Aktivität. Für die in 150 mM NaCl und NaCl-HEPES angefertigten Ansätze lagen die Werte zwischen 38.000 und 100.000 RLU.

Die SKOV3-10-Zellen, die mit den in 5% Glucose komplexierten Ansätzen transfiziert wurden wiesen eine höhere Luciferase-Aktivität, welches durch die

verminderte Toxizität des PEIs bei Verwendung der 5% Glucose-Lösung zu erklären ist.



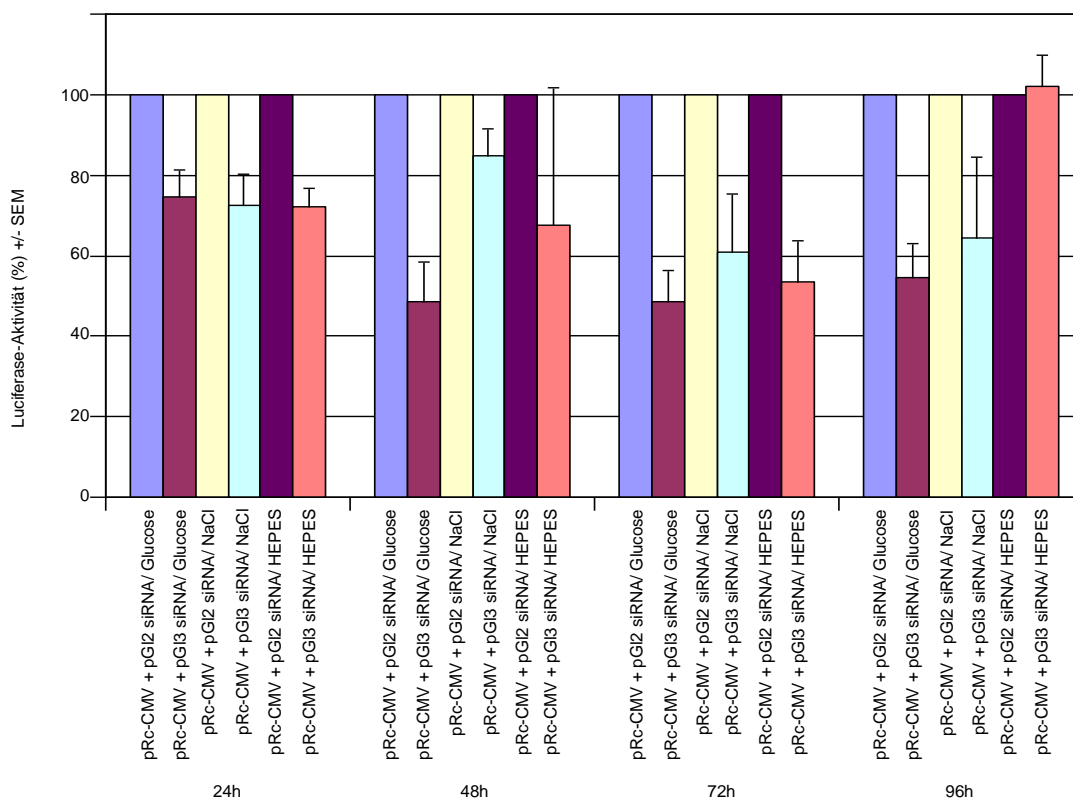
**Abbildung 4.16: Vergleich der Transfektionseffizienz in SKOV3-10-Zellen bei Verwendung eines Ratio 30-Ansatzes nach 24 h, 48 h und 72 h in 5% Glucose, 150 mM NaCl oder NaCl-HEPES, nach Lyophilisierung**

Betrachtet man in Abb. 4.16 die normierten Werte, so sieht man, dass die Herunterregulation der Luciferase-Aktivität für die mit den in 5% Glucose und 150 mM NaCl-Lösung komplexierten Ansätzen behandelten Zellen mit der Transfektionsdauer zunahm. Für die in dem Puffer NaCl-HEPES hergestellten Komplexe konnte nach 24 h keine Herunterregulation aufgezeigt werden, nach 48 h betrug die Herunterregulation ca. 33% und nach 72 h ca. 18%. Eine Herunterregulation auf ca. 50% konnte bei den Zellen, die mit den in 5% Glucose hergestellten Ansätzen transfiziert worden waren, nach 72 h dargestellt werden.

Insgesamt kann nach Normierung der Werte ein eindeutiger Nachweis des siRNA-vermittelten Knockdowns unabhängig von dem Puffer und den damit verbundenen schwankenden Absolutwerten der Luciferase-Aktivität erbracht werden.



Im Folgenden wird nun Bezug genommen auf die mit den lyophilisierten Ratio 20-Ansätzen transfizierten SKOV3-10-Zellen. In Abbildung 4.17 wird die Transfektionseffizienz bei Verwendung eines Ratio 20-Ansatzes nach Lyophilisierung und nach Herstellung und Resolubilisierung in 150 mM NaCl, einer 5% Glucose-Lösung und dem Puffer NaCl-HEPES aufgezeigt. Die siRNA-Menge betrug 20 pmol, pRc-CMV-DNA wurde als unspezifische Träger-DNA zusätzlich zu den Ansätzen gegeben, das siRNA/DNA/PEI-Verhältnis blieb konstant bei Ratio 20. Über Nacht erfolgte die Lyophilisierung.



**Abbildung 4.17: Vergleich der Transfektionseffizienz in SKOV3-10-Zellen bei Verwendung eines Ratio 20-Ansatzes nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h in 5% Glucose, 150 mM NaCl oder dem Puffer NaCl-HEPES, nach Lyophilisierung**

Nach 24 h war für alle behandelten Zellen eine Herunterregulation der Luciferase-Aktivität auf unter 80% nachzuweisen. Nach 48 h prägte sich diese für die mit den in 5% Glucose komplexierten Ansätzen behandelten Zellen weiter aus. Auch bei Beobachtung der späteren Zeitpunkte von 72 und 96 h wurde deutlich, dass die Herunterregulation der Luciferase-Aktivität bei den in 5% Glucose komplexierten siRNA/DNA/PEI-Komplexen am stärksten ausgeprägt war. Bei den im Puffer NaCl-HEPES komplexierten Ansätzen fand

nach 72 h eine Herunterregulation auf ca. 53% statt, nach 96 h war diese nicht mehr nachweisbar. Dies könnte durch eine Verunreinigung in der Zellkultur erklärt werden.

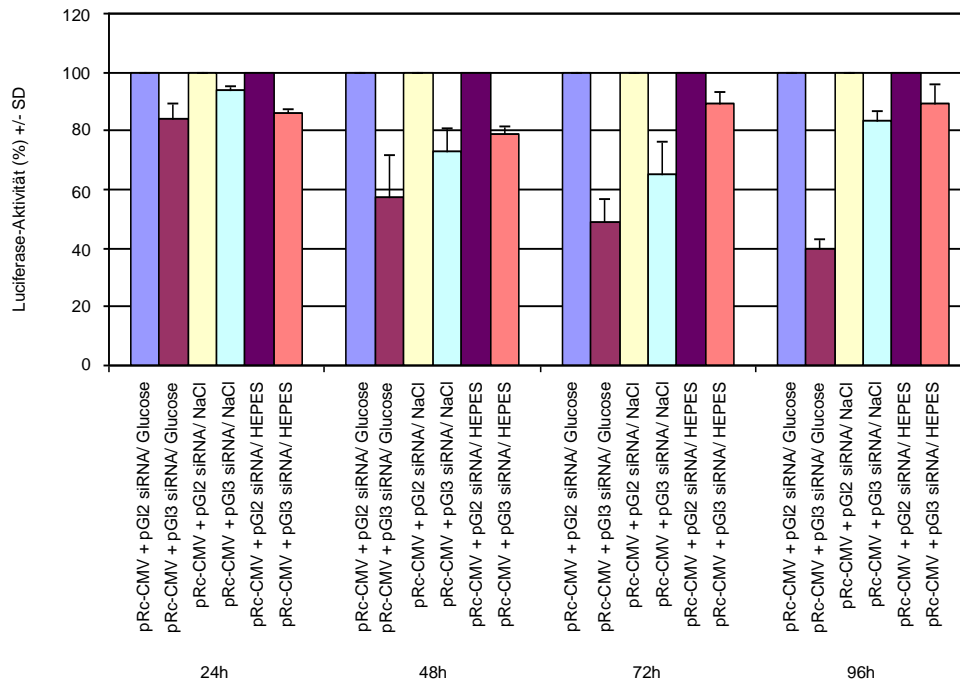
#### **4.9 Vergleich des PEI/siRNA-vermittelten Knockdowns nach Lyophilisierung der Komplexe in Platten versus in Eppendorfgefäßen**

Die Lyophilisierung der PEI/siRNA/DNA-Ansätze erfolgte unter zwei Bedingungen:

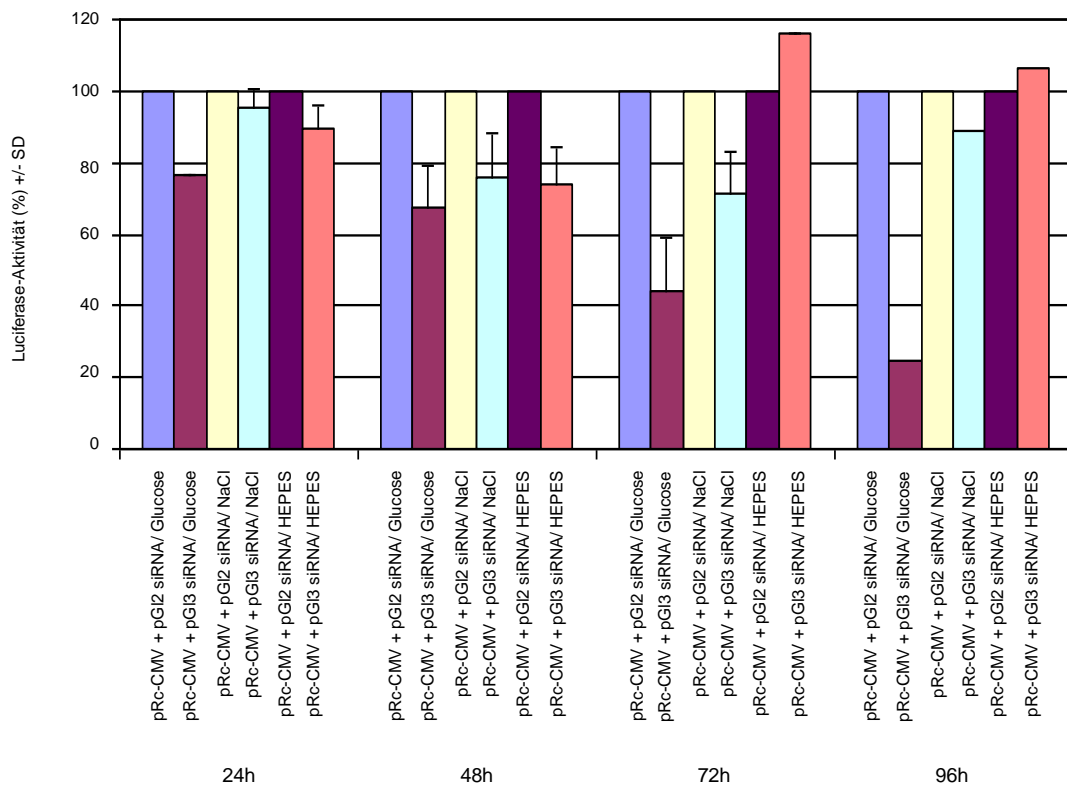
Die PEI/siRNA/DNA-Komplexe wurden wie unter 4.5 beschrieben hergestellt. In dem einen Versuchsarm wurden die Komplexe direkt in 24-Well-Platten pipettiert und über Nacht lyophilisiert, nach 24 h wurden die in Suspension befindlichen Zellen direkt auf die gefriergetrockneten Komplexe in den Platten gegeben und nach gleichmäßiger Verteilung der Zellen inkubiert.

In dem anderen Versuchsarm erfolgte die Lyophilisierung über Nacht in Eppendorfgefäßen, die eingetrockneten Komplexe wurden in DEPC-Wasser aufgenommen und gleichmäßig auf die schon in den Platten ausgesäten, sich noch in Suspension befindlichen Zellen gegeben.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.18:** Vergleich der Transfektionseffizienz in SKOV3-10-Zellen bei Verwendung eines Ratio 20-Ansatzes nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h in 5% Glucose, 150 mM NaCl oder dem Puffer NaCl-HEPES, Lyophilisierung der Ansätze in 24-Well-Platten



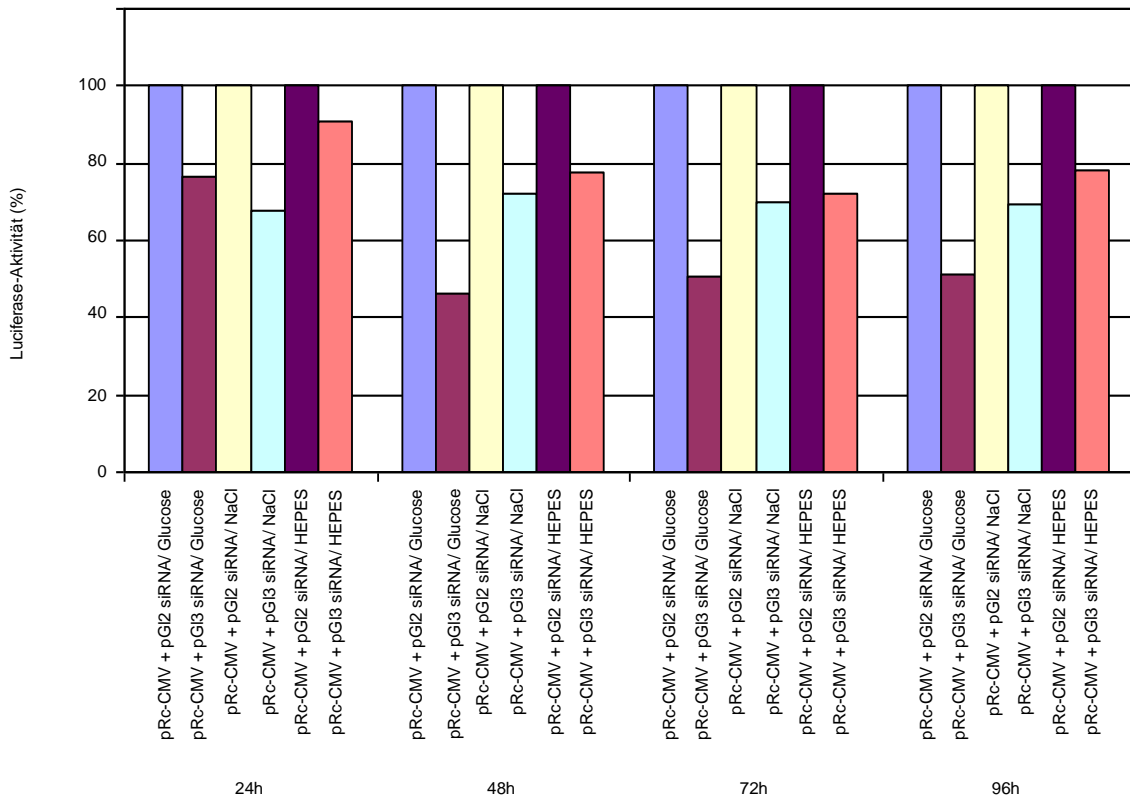
**Abbildung 4.19:** Vergleich der Transfektionseffizienz in SKOV3-10-Zellen bei Verwendung eines Ratio 20-Ansatzes nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h in 5% Glucose, 150 mM NaCl oder dem Puffer NaCl-HEPES, Lyophilisierung der Ansätze in Eppendorfgefäßen

Beim Vergleich der beiden Versuchsbedingungen kann man erkennen, dass die Ergebnisse der beschriebenen Behandlungen große Ähnlichkeit aufweisen. In beiden Abbildungen 4.18 und 4.19 ist dargestellt, dass die Herunterregulation der Luciferase-Aktivität für die in 5% Glucose komplexierten Transfektionsansätze am stärksten ausgeprägt ist. Auch hier liegt das Transfektionsoptimum, gemessen an der Herunterregulation der Luciferase-Aktivität, zeitlich bei 96 h. Für die in dem Puffer NaCl-HEPES komplexierten Ansätze ist die Herunterregulation am schwächsten oder wie im Fall der in Eppendorfgefäßen lyophilisierten Komplexe nach 72 h und 96 h nicht nachweisbar.

#### **4.10 Vergleich des siRNA-vermittelten Gentargetings bei Transfektionen in FCS-freiem und 2% FCS-haltigem Medium**

Der folgend aufgeführte Versuch bezieht sich auf die FCS-Abhängigkeit der Transfektionseffizienz. Die Transfektionsansätze wurden wie unter 4.5 beschrieben hergestellt, es wurden 150 mM NaCl und der Puffer NaCl-HEPES verwendet.

Die SKOV3-10-Zellen wurden im Gegensatz zu vorangegangenen Versuchen jedoch in FCS-freiem IMDM-Medium transfiziert. Nach 24 h erfolgte der Medienwechsel mit 10% FCS-haltigem IMDM-Medium, um ein Zellwachstum zu gewährleisten.



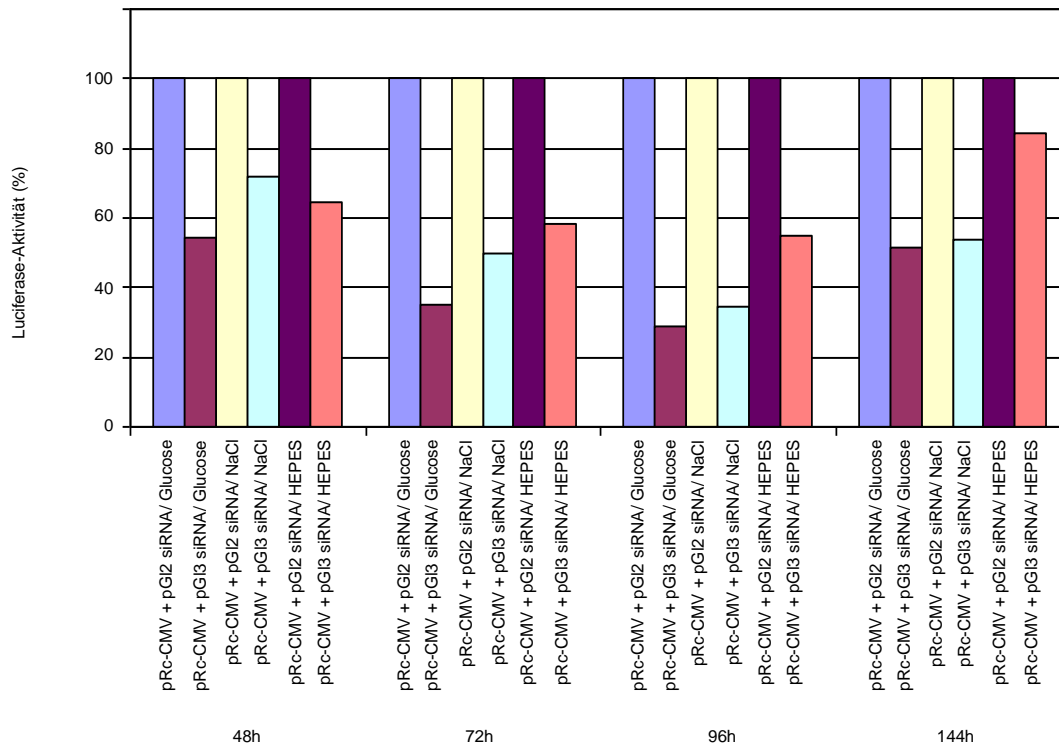
**Abbildung 4.20: Vergleich der Transfektionseffizienz in SKOV3-10-Zellen bei Verwendung eines Ratio 20-Ansatzes nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h in 5% Glucose, 150 mM NaCl oder dem Puffer NaCl-HEPES. Die Transfektion erfolgte in FCS-freiem Medium.**

Abgebildet sind die normierten Werte, um das siRNA-vermittelte Gentergating als prozentuale Herunterregulation besser abbilden zu können.

Schon nach 24 h zeigte sich eine deutliche Herunterregulation auf bis zu 65% für die SKOV3-10-Zellen, die mit den in 150 mM NaCl hergestellten Ansätzen transfiziert worden waren. Bis auf ca. 75% der Ausgangsaktivität wurde die Luciferase in den Zellen, die mit den in 5% Glucose angefertigten Ansätzen behandelt worden waren, herunterreguliert. Die mit den in dem Puffer NaCl-HEPES komplexierten Ansätzen behandelten Zellen erreichten nach 24 h eine Herunterregulation der Luciferase-Aktivität auf ca. 90%.

Nach 48 h und auch bei folgenden Messungen zeigte sich jedoch eine für 5% Glucose am deutlichsten ausgeprägte Herunterregulation, die auf bis 50% erfolgte. Die mit den in 150 mM NaCl oder dem Puffer NaCl-HEPES hergestellten Ansätzen transfizierten Zellen zeigten durchschnittlich eine Herunterregulation auf Werte zwischen 69 und 78%.

Nach Lyophilisierung der Komplexe über Nacht erfolgte die Transfektion der in FCS-freiem Medium ausgesäten SKOV3-10-Zellen. Nach 24 h erfolgte ein Medienwechsel mit 10% FCS.



**Abbildung 4.21: Vergleich der Transfektionseffizienz in SKOV3-10-Zellen bei Verwendung eines Ratio 20-Ansatzes nach 48 h, 72 h, 96 h und 144 h in 5% Glucose, 150 mM NaCl oder dem Puffer NaCl-HEPES. Die Transfektion erfolgte in FCS-freiem Medium nach Lyophilisierung über Nacht**

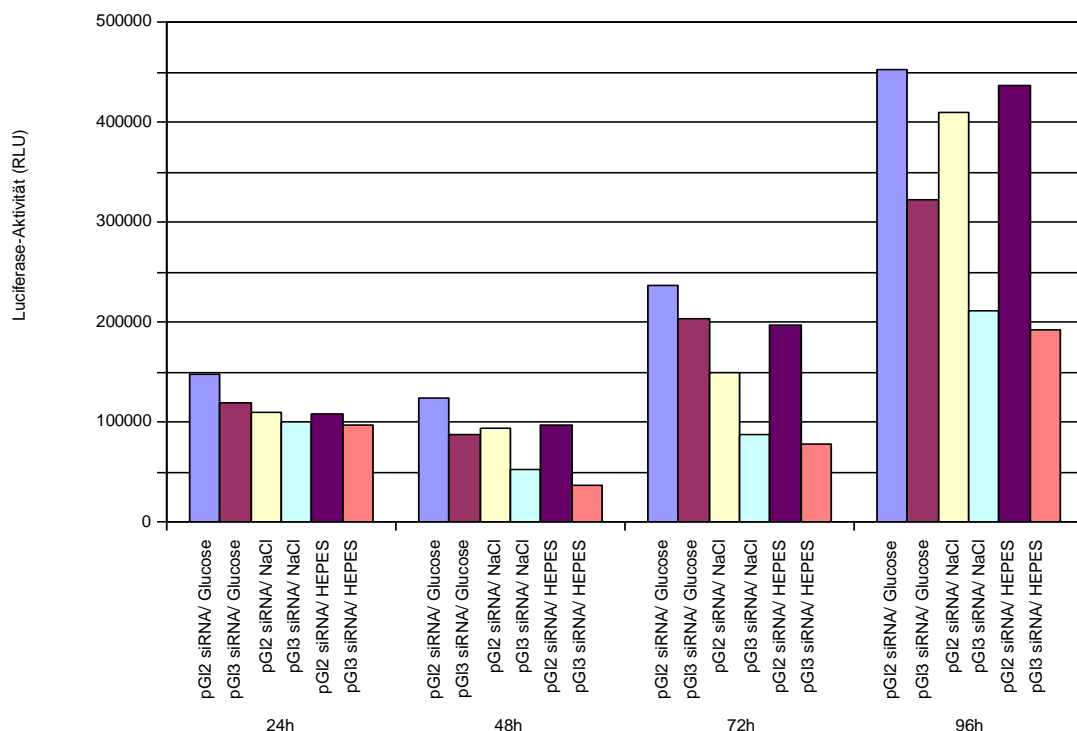
Auch nach Lyophilisierung konnte eine deutliche Herunterregulation und der damit verbundene siRNA-Knockdown nachgewiesen werden. Bei der Messung nach 96 h erreichte die Herunterregulation der Luciferase-Aktivität Werte zwischen 25-55%. Nach 144 h lag die Herunterregulation für die in 5% Glucose und in 150 mM NaCl komplexierten Ansätze noch bei ca. 50%. Die Zellen, die mit den im Puffer NaCl-HEPES komplexierten Ansätzen transfiziert worden waren, zeigten nach 96 h wieder ansteigende Luciferase-Aktivitäten trotz Transfektion mit der spezifischen siRNA.

#### 4.11 Darstellung des siRNA-vermittelten Knockdowns ohne Verwendung von DNA

Bei dieser Transfektion wurden 20 pmol spezifische siRNA pGL3 bzw. die unspezifische siRNA pGL2 in 5% Glucose, 150 mM NaCl oder NaCl-HEPES gelöst. Entsprechend der Lösung bzw. dem Puffer wurde das in 5% Glucose, 150 mM NaCl oder NaCl-HEPES gelöste PEI direkt zu den siRNA-Ansätzen hinzu gegeben. Es wurde eine PEI-Ratio von 20 verwendet.

Die bislang in den vorherigen Versuchen zur Transfektion genutzte unspezifische DNA pRc-CMV kam nicht zur Anwendung. Transfiziert wurden die stabil Luciferase exprimierenden SKOV3-10-Zellen in 2% FCS-haltigem IMDM-Medium.

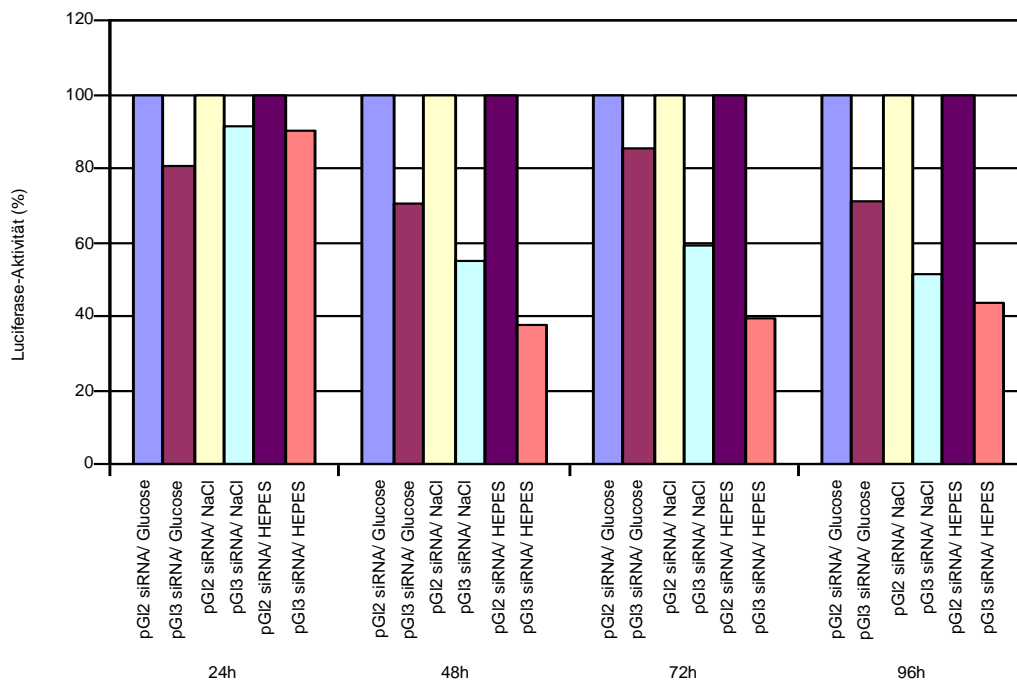
Nach der Komplektierungszeit von 1 h wurden die Ansätze auf die sich noch in Suspension befindlichen Zellen pipettiert. Nach 24 h erfolgten ein Medienwechsel und die erste Messung der Luciferase-Aktivität.



**Abbildung 4.22: Vergleich der Luciferase-Aktivitäten in SKOV3-10-Zellen ohne Verwendung der DNA pRc-CMV als Komplektierungshilfe nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h in 5% Glucose, 150mM NaCl oder dem Puffer NaCl-HEPES**

Die absoluten Werte der detektierten Luciferase-Aktivität steigen abhängig von den Messzeitpunkten bis zu dem gemessenen Maximum bei 96 h an. Dies kann

mit dem zeitabhängigen Wachstum der SKOV-3-Zellen und der damit verbundenen vermehrten Luciferase-Expression erklärt werden.



**Abbildung 4.23: Vergleich der Transfektionseffizienz in SKOV3-10-Zellen ohne Verwendung der DNA pRc-CMV als Komplexierungshilfe nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h in 5% Glucose, 150 mM NaCl oder dem Puffer NaCl-HEPES**

Betrachtet man die normierten Werte, erkennt man, dass nach 24 h lediglich Tendenzen der Herunterregulation zu beobachten sind, diese liegen zwischen 10 und 20%.

Die Herunterregulation der Luciferase-Aktivität bleibt nach 48, 72 und 96 h für die einzelnen Ansätze weitestgehend konstant, d.h. für die Ansätze mit 5% Glucose ca. 20-30%, für die 150 mM NaCl-Ansätze ca. 40-55% und für die NaCl-HEPES-Ansätze ca. 55-60%.

Vergleicht man dies mit vorherigen Versuchen, in denen pRc-CMV-DNA zusätzlich verwendet wurde (s. in Abb. 4.14 die Darstellung der mit dem Ansatz der Ratio 20 behandelten Zellen), so erkennt man, dass ebenfalls für die in 150 mM NaCl und in NaCl-HEPES komplexierten Ansätze die stärkste Herunterregulation erreicht wurde. Dieses wird auch in Abb. 4.14 nach 48 h deutlicher und erreicht Werte der Herunterregulation auf 30-40%.

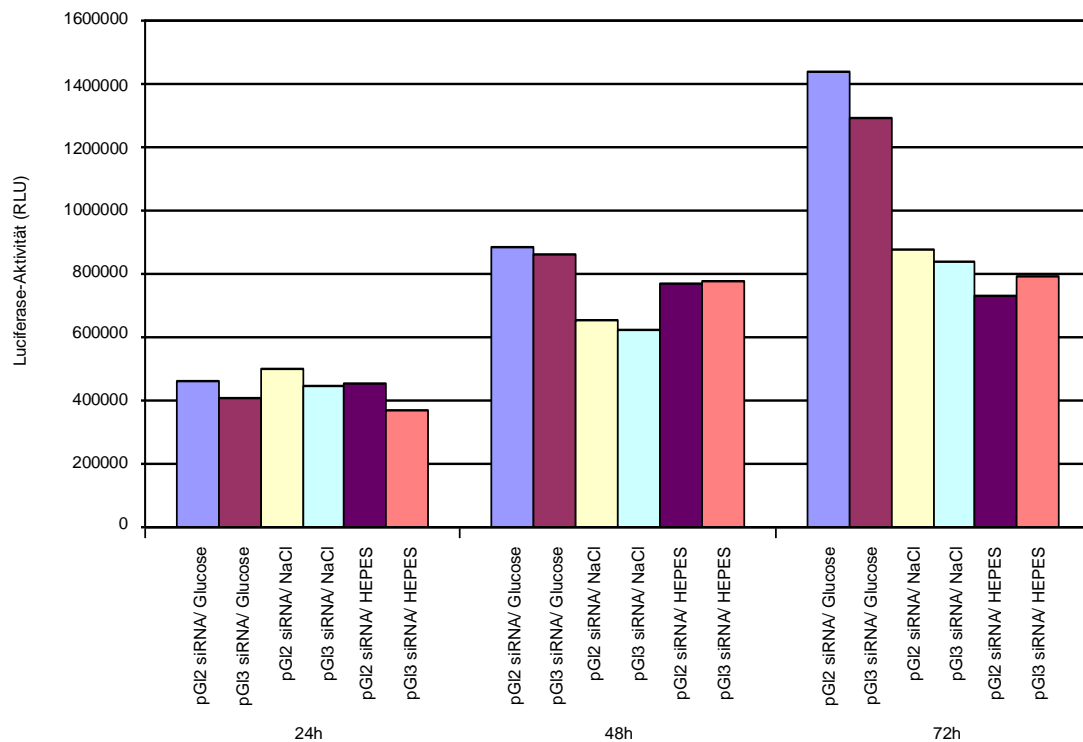
Die ansteigenden Luciferase-Aktivitäten und die vermehrte Herunterregulation der Luciferase-Aktivität durch den spezifischen Gen-Knockdown können in Abb.



4.22 und in Abb. 4.23 am ehesten mit dem zeitabhängigen Wachstum der SKOV-3-10-Zellen erklärt werden.

#### 4.12 Darstellung des siRNA-vermittelten Knockdowns nach Lyophilisierung der Komplexe ohne Verwendung von DNA

Nach den unter 4.11 beschriebenen Bedingungen wurden die Komplexe gebildet, diese aber nach einer Komplexierungszeit von 1 h über Nacht lyophilisiert. Die Resolubilisierung erfolgte in den entsprechenden Solventien und die Ansätze wurden direkt auf die sich noch in Suspension befindlichen SKOV3-10-Zellen pipettiert. Nach 24 h erfolgten ein Medienwechsel und die erste Messung der Luciferase-Aktivität.



**Abbildung 4.24: Vergleich der Luciferase-Aktivitäten in SKOV3-10-Zellen ohne Verwendung der DNA pRc-CMV als Komplexierungshilfe nach 24 h, 48 h und 72 h in 5% Glucose, 150 mM NaCl oder dem Puffer NaCl-HEPES nach Lyophilisierung**

Die Messungen erfolgten nach 24, 48 und 72 h, wobei hier im Vergleich mit den Absolutwerten der unter 4.11 beschriebenen Transfektionen die Werte viel höher lagen. Dies kann mit einer verminderten Toxizität des PEIs nach

Lyophilisierung und einem damit verbundenen vermehrten Wachstum der SKOV3-10-Zellen erklärt werden.

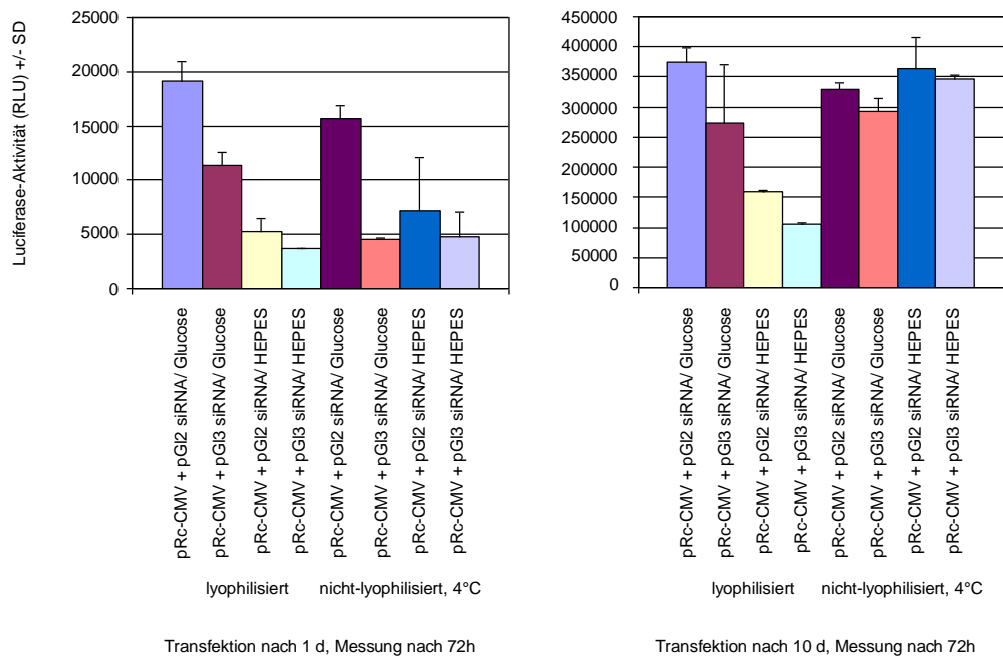
Ein zeitabhängiger Anstieg der gemessenen Luciferase-Aktivität war vor allem für die mit 5% Glucose behandelten Zellen zu beobachten.

#### **4.13 Vergleich der Transfektionseffizienzen nach Lagerung lyophilisierter oder in Lösung befindlicher Komplexe**

In dieser Versuchsreihe wurden die Komplexe mit pRc-CMV-DNA und spezifischer siRNA pGL3 bzw. unspezifischer siRNA pGL2 in der PEI-Ratio 20 in 5% Glucose-Lösung und dem Puffer NaCl-HEPES hergestellt. Die Transfektion der SKOV3-10-Zellen erfolgte nicht wie zuvor direkt nach der Komplexierung, sondern nach Lagerung der Komplexe für 1 und 10 d bei 4°C.

Die eine Hälfte der Ansätze wurde nach der Komplexierungszeit von 1 h in 24-Well-Platten pipettiert und über Nacht lyophilisiert, die andere Hälfte der Ansätze wurde ebenfalls in 24-Well-Platten pipettiert, dann aber bei 4°C im Kühlschrank steril gelagert.

Nach 1 bzw. 10 d erfolgte dann die Resolubilisierung der lyophilisierten Komplexe und die Transfektion der SKOV3-10-Zellen durch direkte Aussaat von 60.000 Zellen/Well. Bei den Ansätzen, die ohne Lyophilisierung bei 4°C gelagert worden waren, wurden die SKOV3-10-Zellen direkt hinzu pipettiert.



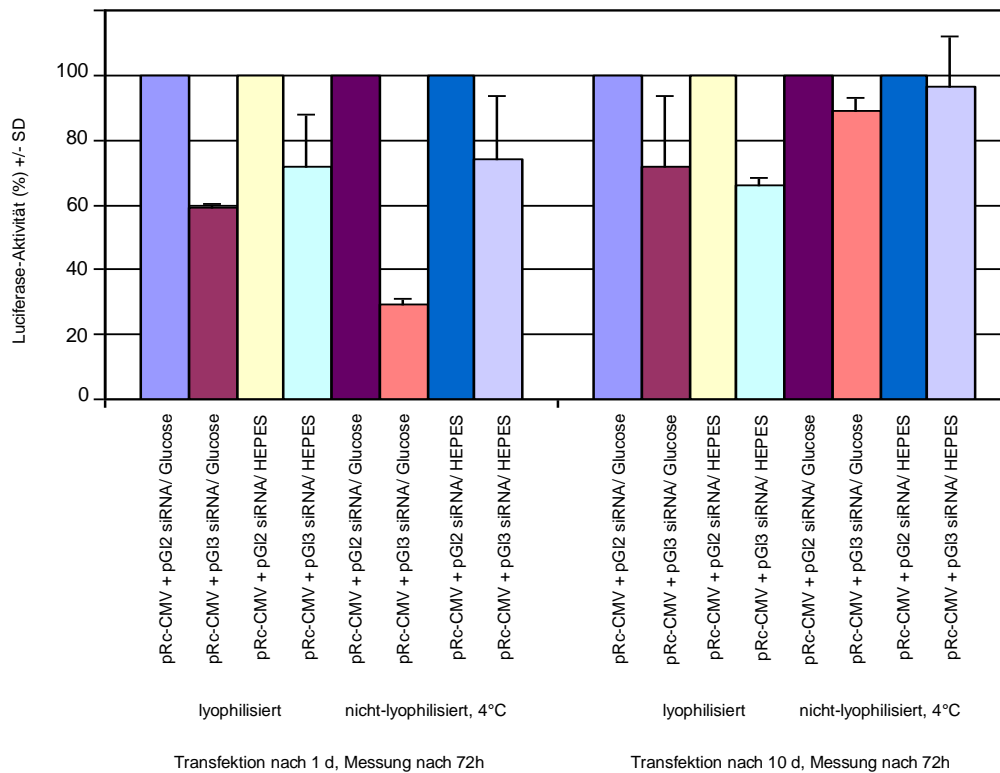
**Abbildung 4.25: Vergleich der Luciferase-Aktivitäten in SKOV3-10-Zellen nach 72 h in 5% Glucose oder NaCl-HEPES nach Lagerung der Komplex-Lösungen bzw. der lyophilisierten Komplexe für 1 bzw. 10 d**

Dargestellt wird ein Vergleich der mit den Komplex-Lösungen behandelten Zellen und der mit den über Nacht lyophilisierten Ansätzen behandelten Zellen. Die Transfektion der Zellen erfolgte nach der Gefriertrocknung oder der Lagerung der Komplexe bei 4°C direkt am folgenden Tag oder nach 10 d in 2% FCS-haltigem Medium, ein Medienwechsel erfolgte 24 h nach Transfektion mit 10% FCS-haltigem Medium. Gemessen wurde die Luciferase-Aktivität nach 72 h. In Abb. 4.25 sind die Ergebnisse nach 72 h dargestellt.

Auffällig ist, dass die absoluten Zellzahlen der nach 1 d und nach 10 d behandelten Zellen stark voneinander abwichen und dass die nach 10 d behandelten Zellen eine vermehrte Grund-Luciferase-Aktivität aufwiesen. Dies ist am ehesten auf die Kultivierung der Zellen und die schwankenden Wachstumsbedingungen zurückzuführen.

Bei den in NaCl-HEPES komplexierten Ansätzen, die lyophilisiert wurden, war nach 72 h eine insgesamt niedrigere Aktivität zu messen als bei den in 5% Glucose komplexierten Ansätzen. Dies könnte auf die unspezifische Toxizität des Puffers NaCl-HEPES zurückgeführt werden.

Um die siRNA-vermittelte Herunterregulation der Luciferase-Aktivität besser darzustellen, werden in Abb. 4.26 normierte Werte aufgeführt.



**Abbildung 4.26: Vergleich der Herunterregulation der Luciferase-Aktivitäten in SKOV3-10-Zellen nach 72h in 5% Glucose oder NaCl-HEPES, nach Lyophilisierung oder nach Zusatz der bei 4°C gelagerten Komplexe, Aussaat der Zellen nach 1 und 10 d**

Bei der Darstellung der normierten Werte wird eine Herunterregulation der Luciferase-Aktivität nach 1 d für die nicht-lyophilisierten bei 4°C gelagerten Ansätze, die in 5 % Glucose und in NaCl-HEPES hergestellt wurden, aufgezeigt. Dieser Effekt ist ebenfalls bei den mit den lyophilisierten Komplexen behandelten Zellen zu erkennen.

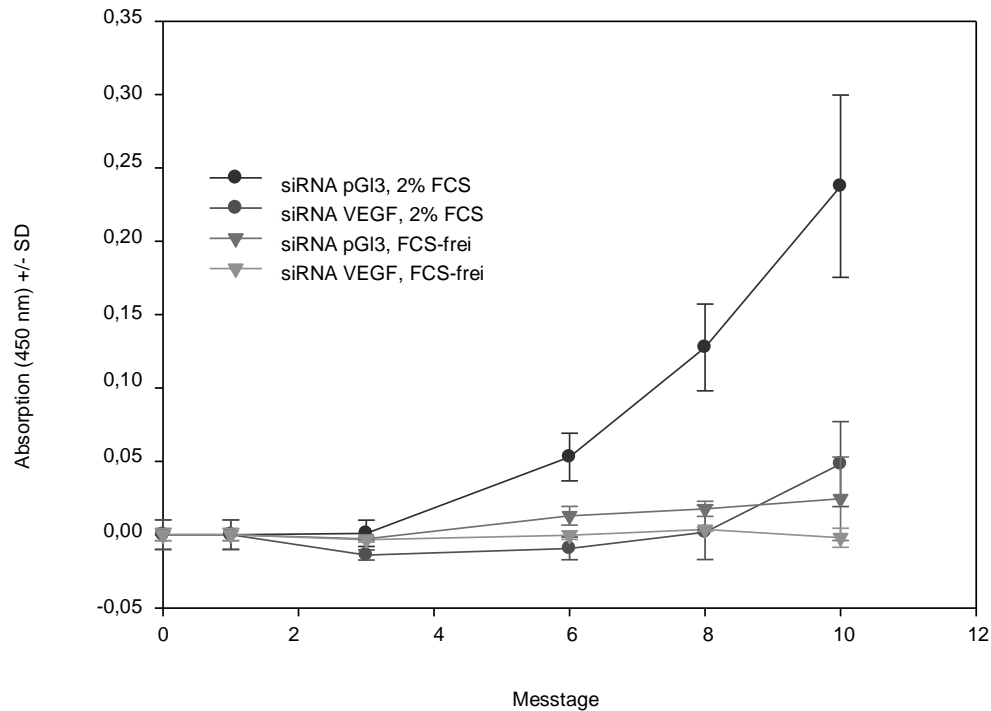
Nach längerer Lagerungszeit von 10 d sind die Herunterregulation und damit der siRNA-vermittelte Gen-Knockdown für die mit der bei 4°C gelagerten Komplexlösung transfizierten Zellen kaum noch nachweisbar. Für die lyophilisierten Ansätze wird auch nach 10 d eine Herunterregulation bis auf ca. 60% erreicht. Die Lyophilisierung ist damit für die längere Lagerung der Komplexe geeignet und anwendbar für die in 5% Glucose und dem Puffer NaCl-HEPES komplexierten Ansätze.

#### **4.14 Verminderte PC3-Zellproliferation durch PEI/siRNA-vermitteltes VEGF-Targeting**

In diesen Versuchen wurde die im Nacktmausmodell mit aggressivem Wachstumsverhalten beschriebene Prostatakarzinomzelllinie PC3 verwendet, welche androgen-unabhängig wächst und den Wachstumsfaktor VEGF überexprimiert. Dieser Wachstumsfaktor stimuliert die Proliferation durch Erhöhung der vaskulären Permeabilität und ist so für das Wachstum der Karzinomzellen mit verantwortlich.

Wachstumsassays wie der WST-Assay dienen zur Verdeutlichung, dass eine VEGF-Reduktion durch Targeting mittels VEGF-siRNA zu einer Wachstumshemmung der behandelten PC3-Zellen führt. Dieser direkt nachweisbare antiproliferative Effekt wäre dann eine Funktionsüberprüfung des F25-LMW-PEI, welches zur Einschleusung der VEGF-siRNA genutzt wurde.

Bei diesem WST-Proliferationsassay wurden 750 Zellen/Well in eine 96-Well-Platte ausgesät. Nach 24 h Wachstum erfolgte zunächst die 1. Messung und wurde in nachfolgender Abb. 4.27 bei Messzeitpunkt 0 angeordnet. Erst nach dieser Messung erfolgte die Transfektion der ausgesäten Zellen in jedes einzelne Well. Die Transfektion erfolgte analog der beschriebenen Anleitung im Kapitel 3.2.12 in 2% FCS-haltigem Medium. Ein Medienwechsel erfolgte nach 5 h entweder mit FCS-freiem IMDM-Medium oder mit 2% FCS-haltigem Medium.



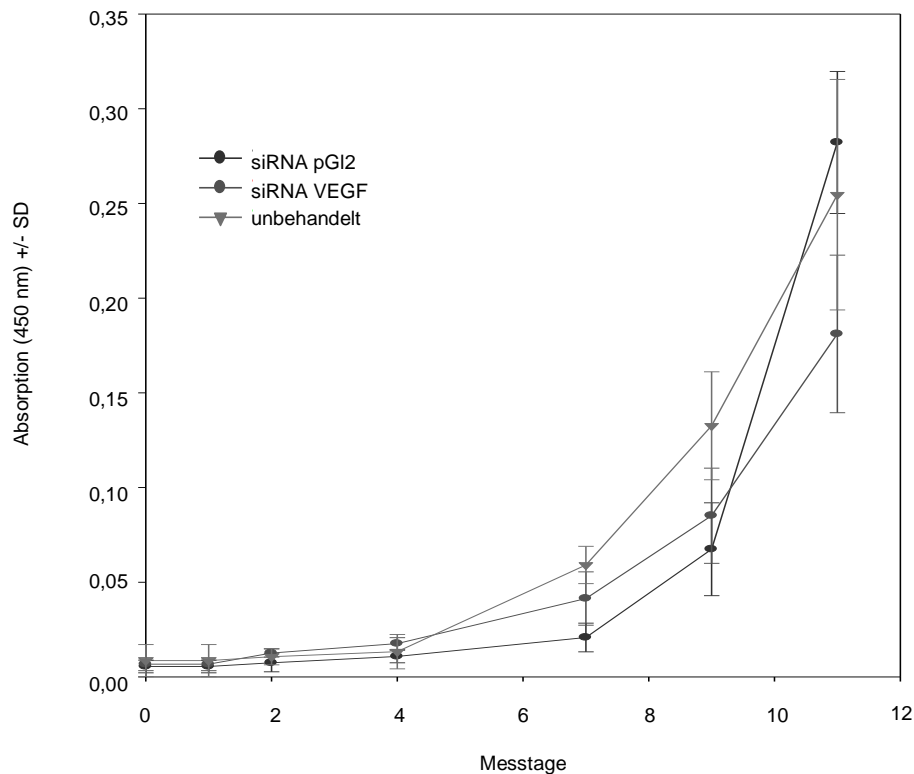
**Abbildung 4.27: PC3-WST-Assay mit 750 Zellen/Well, Vergleich der Wachstumshemmung von PC3-Zellen bei Zugabe von spezifischer VEGF-siRNA oder unspezifischer pG13-siRNA in FCS-freiem und 2% FCS-haltigem IMDM-Medium**

Bei der Darstellung der Werte im Graphen wird deutlich, dass ein Wachstum nur für die Zellen möglich ist, die in 2% FCS-haltigem Medium kultiviert wurden. Bei den in FCS-freiem Medium kultivierten Zellen ist eine Proliferation nicht nachweisbar. Die mit der unspezifischen siRNA pG13 behandelten Zellen, die in 2% FCS-haltigem IMDM-Medium inkubiert wurden, zeigen ein zeitabhängiges Wachstum bis zum gemessenen Tag 10. Dieses würde bei Wahl eines längeren Zeitintervalls begrenzt durch die zunehmende Konfluenz der Zellen in der vorgegebenen Wellgröße. Mit der zunehmenden Zeit nimmt der Nährgehalt des Mediums ebenfalls ab.

Eine stark verminderte Proliferation findet man für die mit der VEGF-siRNA behandelten Zellen, was als siRNA-vermittelter Knockdown des Wachstumsfaktors VEGF gewertet werden kann.

Ein weiterer WST-Assay erfolgte mit 1.000 Zellen/Well in einer 96-Well-Platte. Diese PC3-Zellen waren im Gegensatz zum oben beschriebenen WST-Assay vor ihrer Aussaat in die Wells transfiziert worden. Die Transfektion sowie auch die spätere Inkubation der Zellen erfolgten in 2% FCS-haltigem Medium, da im

vorherigen Versuch (s. Abb. 4.27) kein Wachstum der Zellen in FCS-freiem Nährmedium aufgezeigt werden konnte.



**Abbildung 4.28: PC3-WST-Assay mit 1000 Zellen/Well, Vergleich der Wachstumshemmung von PC3-Zellen bei Zugabe von spezifischer VEGF-siRNA oder unspezifischer pGL2-siRNA in 2% FCS**

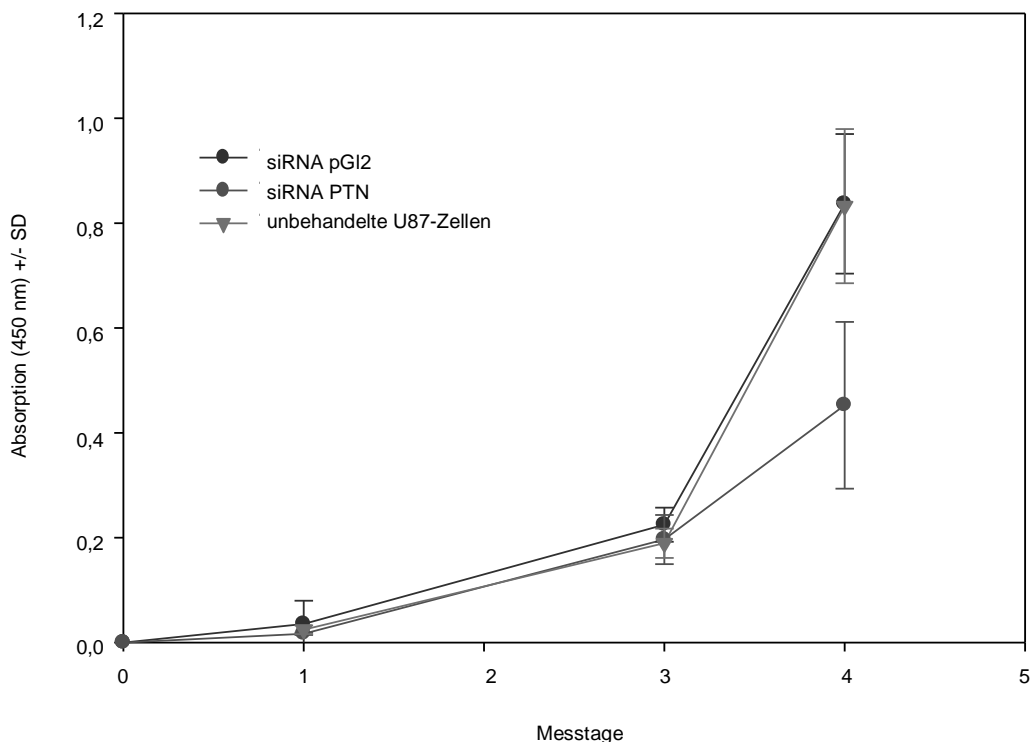
Betrachtet werden die Wachstumskurven von unbehandelten, mit unspezifischer pGL3-siRNA und mit spezifischer VEGF-siRNA behandelten PC3-Zellen. Die unbehandelten Zellen zeigen eine kontinuierliche Proliferation. Auch die mit der siRNA pGL3 transfizierten Zellen wachsen proportional zur Wachstumsdauer an, wobei der sehr steile Anstieg der Wachstumskurve zwischen dem 9. und 11. Messtag zu beachten ist. Zwar zeigen auch die mit der VEGF-siRNA behandelten PC3-Zellen eine kontinuierlich ansteigende Wachstumskurve, doch ist diese im Gegensatz zu den vorher beschriebenen messbar flacher.

Erst nach dem 9. Messtag ist die Differenz zwischen den mit der unspezifischen siRNA transfizierten Zellen und der mit der spezifischen siRNA behandelten PC3-Zellen graphisch darzustellen und es hat ein messbares siRNA-Knockdown stattgefunden.

#### 4.15 Proliferationsassay mit U87-Zellen

Ein weiterer WST-Proliferationsassay erfolgte mit U87-Zellen, einer Glioblastomzelllinie, die unter anderem den Heparin-bindenden Wachstumsfaktor PTN exprimieren. Die U87-Zellen wurden nicht behandelt und das native Wachstum entweder den mit der spezifischen PTN-siRNA oder den mit der unspezifischen pGI3-siRNA transfizierten U87-Zellen gegenüber gestellt.

Die Transfektionsansätze wurden wie unter 3.2.12 beschrieben in NaCl-HEPES hergestellt. Je 100.000 U87-Zellen wurden in ein Well einer 6-Well-Platte in 2% FCS-haltiges IMDM-Medium ausgesät und anschließend mit den Ansätzen transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden 24 h später in die 96-Well-Platten in 10% FCS-haltiges Medium transferiert. Die Messungen der Absorption bei 450 nm erfolgten jeweils nach 24 h.



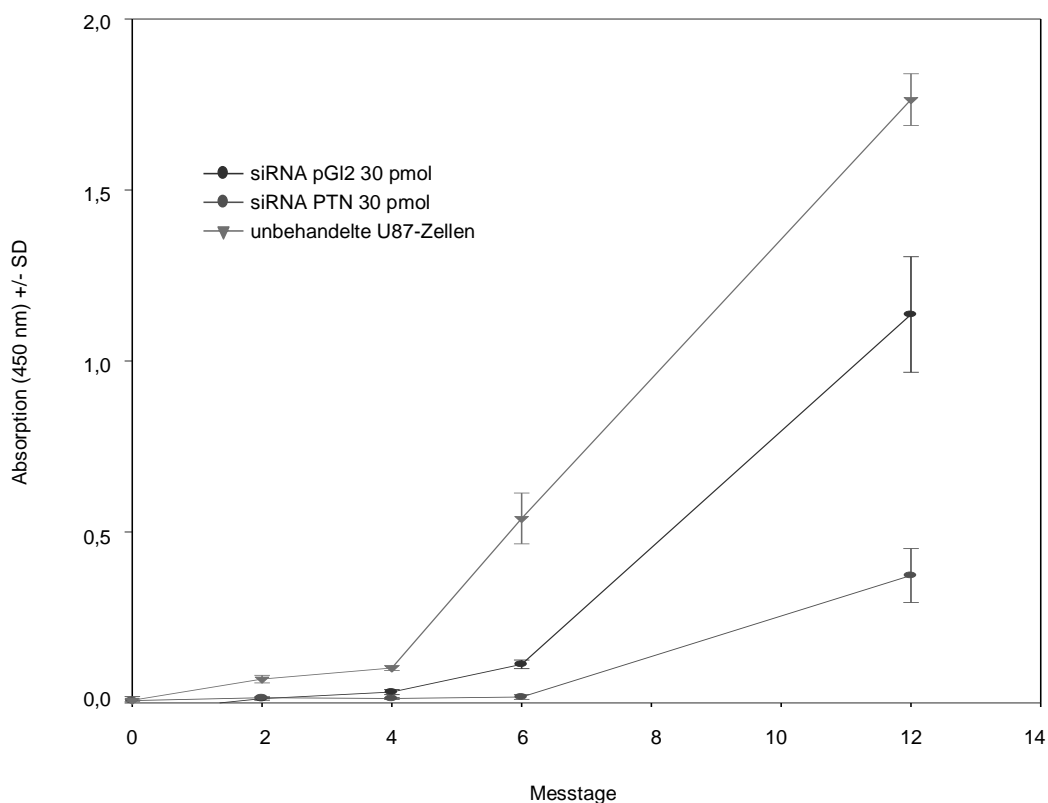
**Abbildung 4.29: U87-WST-Assay mit 1.000 Zellen/Well, Vergleich der Wachstumshemmung von U87-Zellen bei Zugabe von spezifischer PTN-siRNA oder unspezifischer pGI2-siRNA in 2% FCS**

Nach 3 d war noch keine Divergenz im Kurvenverlauf der einzelnen Ansätze zu erkennen. Die Messung am 4. Tag zeigte jedoch deutlich, dass eine verminderte Proliferation der mit der spezifischen PTN-siRNA behandelten



Zellen stattfand. Die unbehandelten U87-Zellen und die mit der unspezifischen siRNA pGI2 behandelten Zellen wiesen das gleiche Wachstumsverhalten auf. In diesem Proliferationsassay konnte die PTN-siRNA-vermittelte Wachstums-  
hemmung der U87-Zellen dargestellt werden.

Aufgezeigt wird hier ein weiteres Ergebnis eines WST-Assays, bei dem auf das Wachstumsverhalten der unbehandelten Zellen nochmals eingegangen werden soll. Die Transfektion erfolgte in den 6-Well-Platten, in jedem Well waren 100.000 U87-Zellen ausgesät worden. Pro Well einer 6-Well-Platte wurden 30 pmol siRNA und dazu entsprechend der Ratio 10 F25-LMW-PEI eingesetzt. Die Aussaat der Zellen erfolgte am nächsten Tag in 96-Well-Platten. Die erste Messung erfolgte 24 h später und wurde als Messtag 0 bezeichnet.

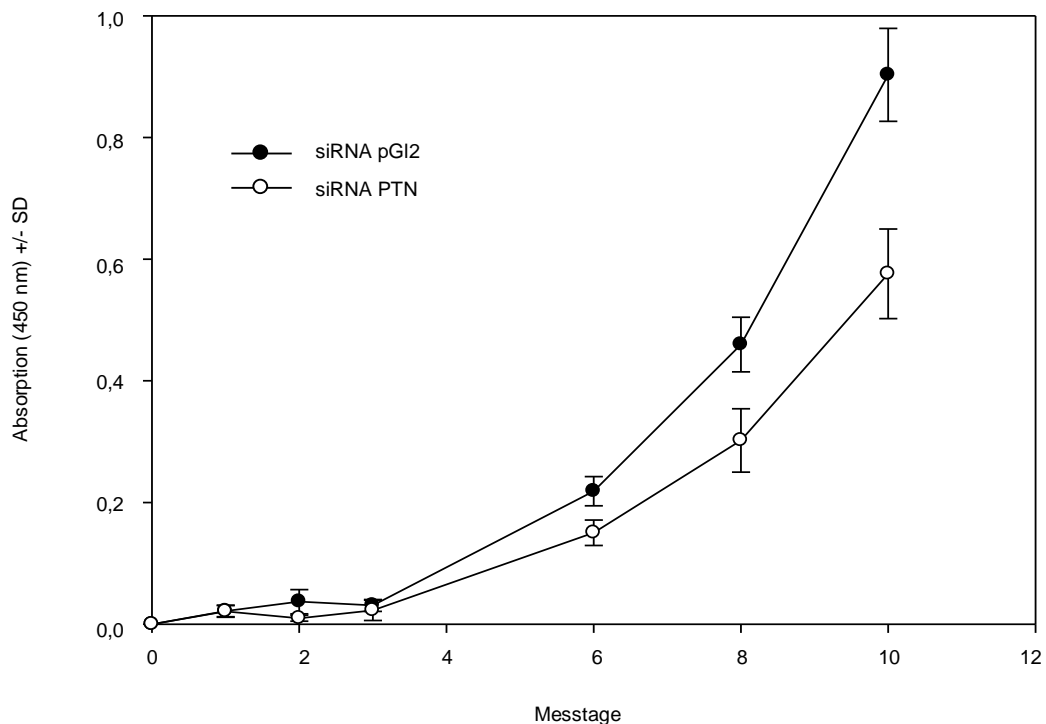


**Abbildung 4.30: U87-WST-Assay mit 1.000 Zellen/Well, Vergleich der Wachstumshemmung von U87-Zellen bei Zugabe von 30 pmol spezifischer PTN-siRNA oder 30 pmol unspezifischer pGI2-siRNA in 2% FCS**

Deutlicher als in Abb. 4.29 ist hier das uneingeschränkte Wachstum der unbehandelten U87-Zellen zu beobachten, die dem für das F25-LMW-PEI unspezifischen toxischen Effekt nicht ausgesetzt sind. Eine Einschränkung des Wachstums für die mit der spezifischen PTN-siRNA behandelten Zellen ist im

Vergleich zu den Zellen, die mit der unspezifischen pGI3-siRNA behandelt wurden, gut nachweisbar.

Die Möglichkeit der Lyophilisierung und die anschließende Transfektion der Zellen sowie das Wachstumsverhalten wurden in folgendem Experiment dargestellt. Analog den zuvor aufgezeigten Versuchen erfolgte vor der Transfektion die Lyophilisierung der Komplexe und die anschließende Resolubilisierung in dem Puffer NaCl-HEPES. Die Transfektion erfolgte in 6-Well-Platten, die Zellen wurden nach 24 h in die 96-Well-Platten ausgesät. Die erste Messung erfolgte wiederum nach 24 h und wurde als Messtag 0 bezeichnet.



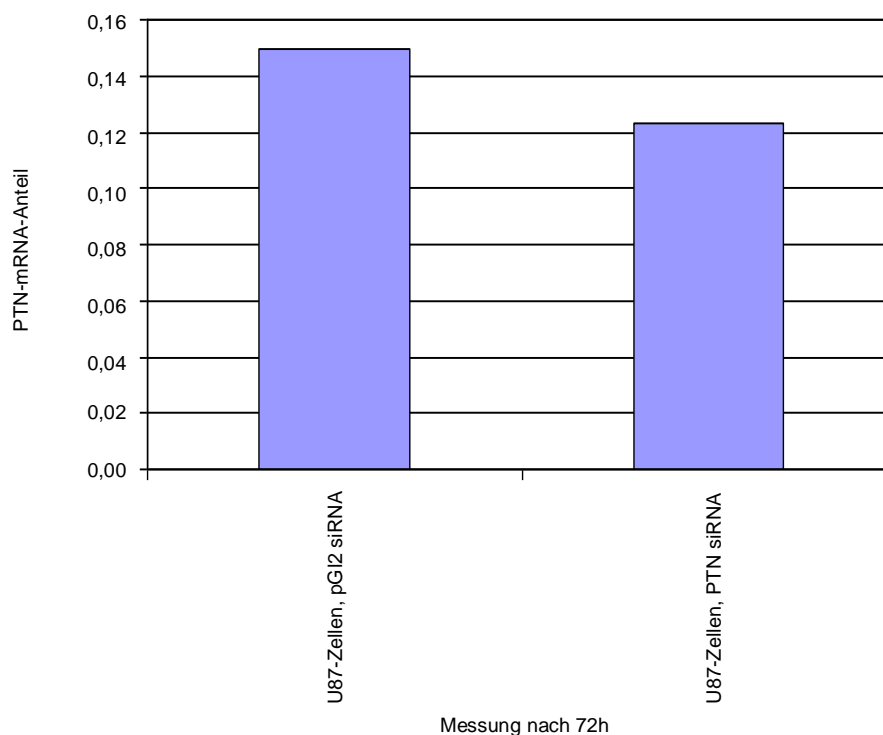
**Abbildung 4.31:** U87-WST-Assay mit 1.000 Zellen/Well, Vergleich der Wachstumshemmung von U87-Zellen bei Zugabe von 30 pmol spezifischer PTN-siRNA oder 30 pmol unspezifischer pGI2-siRNA in 2% FCS, nach Lyophilisierung

Nach der Lyophilisierung der Ansätze und folgender Transfektion der U87-Zellen war ebenfalls ein vermindertes Zellwachstum der mit der spezifischen PTN-siRNA behandelten Zellen zu beobachten. Dieser Effekt war erst ab Tag 6 erkennbar.

Die antiproliferative Wirkung durch PEI/siRNA-vermitteltes Gentargeting war nach einem längeren Zeitraum von 10 d deutlich darstellbar.

#### 4.16 Northern-Blot: PTN-Herunterregulation

Es wurde die PEI-vermittelte Transfektion der U87-Glioblastom-Zellen mit 30 pmol spezifischer PTN-siRNA bzw. unspezifischer pG12-siRNA durchgeführt. Nach 48 bzw. 72 h erfolgte die RNA-Präparation wie unter 3.2.9 beschrieben. Im Anschluss diente die Methode des Northern-Blots dem Nachweis des PTN-Targetings bei den mit der spezifischen PTN-siRNA transfizierten Zellen. Das spezifische Gentargeting konnte durch den verminderten PTN-mRNA-Gehalt in den Zellen nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurde der PTN-mRNA-Anteil der unbehandelten U87-Zellen mit aufgeführt.



**Abbildung 4.32: Northern-Blot: PTN-mRNA-Anteil U87-Zellen, die mit spezifischer PTN-siRNA sowie unspezifischer pG12-siRNA transfiziert wurden**

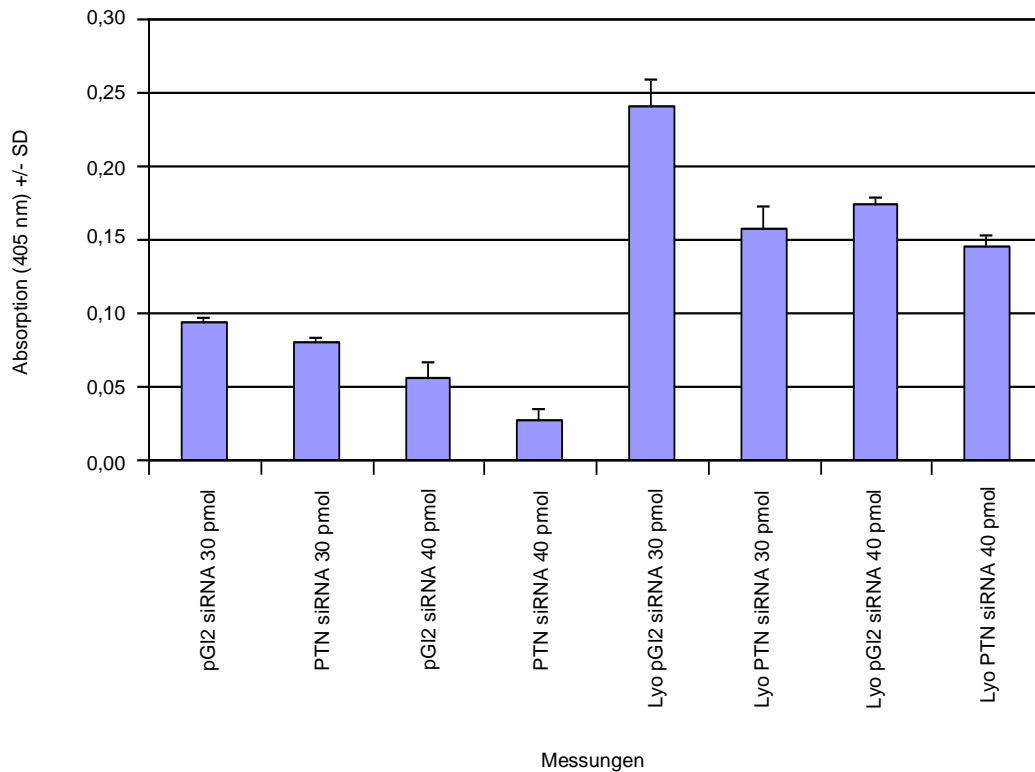
Vergleicht man die Überstände der mit der PTN-siRNA bzw. der mit der unspezifischen pG12-siRNA behandelten Zellen, dann fällt auf, dass eine Herunterregulation des PTN-mRNA-Gehaltes stattgefunden haben muss, da der PTN-mRNA-Gehalt bei den mit der unspezifischen siRNA behandelten Zellen höher liegt.

In der Messung nach 72 h zeigten sich eine messbare Herunterregulation und damit der Nachweis des siRNA-Knockdowns im Gegensatz zu den mit der unspezifischen pGI2-siRNA behandelten U87-Zellen.

#### **4.17 PTN-ELISA**

Der PTN-ELISA diente dem Nachweis der Herunterregulation von PTN auf der Proteinebene, welches durch die verwendeten U87-Glioblastomzellen im Medium messbar sekretiert wird. Zur Durchführung des PTN-ELISAs wurden die Mediumüberstände der für den WST-Assay transfizierten Zellen zusammengeführt und nach Protokoll für den PTN-ELISA, wie in 3.2.4.5 und 3.2.11 beschrieben, bearbeitet. Aus der Gegenüberstellung der Extinktionswerte der Proben mit denen der Standardreihe konnten die Konzentrationen des sekretierten PTN im Medium direkt ermittelt werden. In diesem Versuch wurden Überstände von Zellen verwendet, die mit 30 pmol und mit 40 pmol pGI2- bzw. PTN-siRNA PEI-vermittelt transfiziert worden waren. Die PEI/siRNA-Ratio war konstant.

Die eine Hälfte der U87-Zellen wurde mit lyophilisierten Ansätzen transfiziert, die andere Hälfte mit neu angesetzten Komplexen am Folgetag.



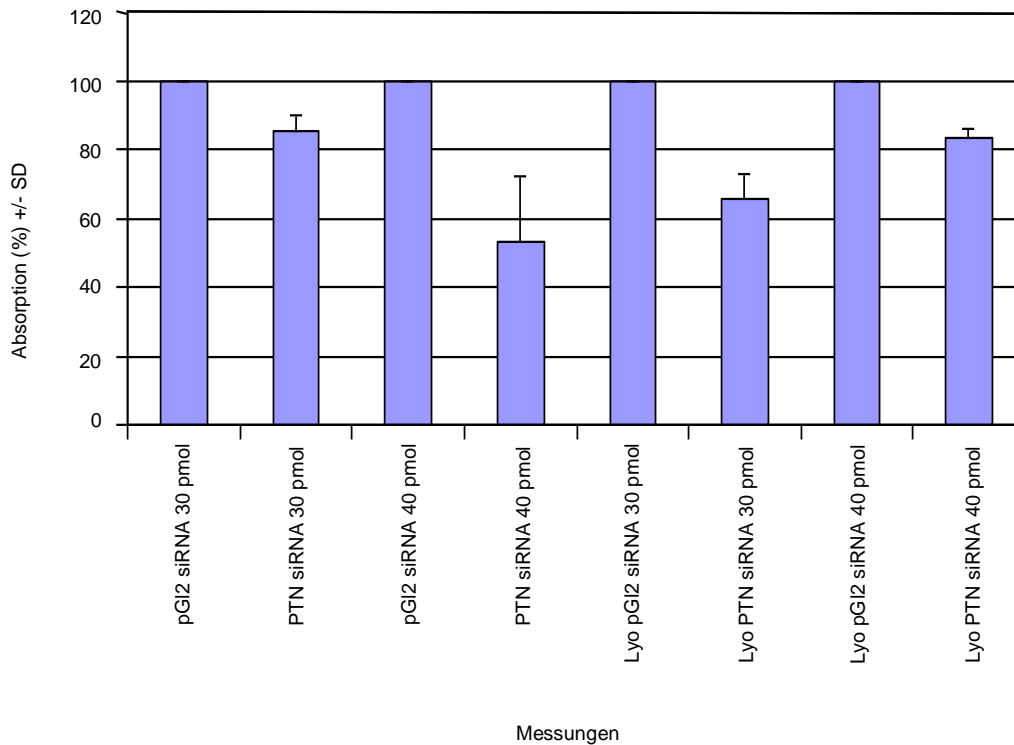
**Abbildung 4.33: PTN-ELISA: Vergleich der Herunterregulation des PTN in U87-Zellen bei Verwendung von 30 pmol bzw. 40 pmol spezifischer PTN-siRNA oder unspezifischer pGI2-siRNA, PEI-vermittelte Transfektion mit frischen oder mit lyophilisierten Komplexen**

Bei der graphischen Darstellung des oben beschriebenen Versuches fällt zunächst auf, dass die mit den lyophilisierten Ansätzen behandelten Zellen insgesamt höhere PTN-Mengen sekretieren, die durch den PTN-ELISA im Medium detektiert werden können. Die Zelldichte und die Wachstumsbedingungen waren in beiden Versuchsreihen gleich.

Der PEI-vermittelte siRNA-Knockdown und die damit verbundene Herunterregulation des PTNs bei Verwendung von PTN-siRNA ist bei allen mit der spezifischen siRNA behandelten Zellen nachweisbar, da hier ein verminderter PTN-Gehalt im Serum zu messen ist. Dieser Effekt ist sowohl bei den mit den frisch behandelten Komplexen als auch bei den mit den lyophilisierten Ansätzen behandelten U87-Zellen vorzufinden.

Unterschieden werden muss die Menge der verwendeten siRNA (30 pmol versus 40 pmol), da es auffallend ist, dass die Zellen, die mit der größeren siRNA-Menge transfiziert wurden, weniger PTN in das Serum sekretieren. Da bei den verschiedenen siRNA-Mengen-Ansätzen die PEI-Ratio konstant war, kann man auch hier den zytotoxischen Effekt des PEIs als Erklärungsversuch vorweisen.

Zur Verdeutlichung des PEI-vermittelten siRNA-Knockdowns wurden die Werte aus der Abb. 4.33 normiert und nochmals graphisch dargestellt.



**Abbildung 4.34: PTN-ELISA – normierte Werte: Vergleich der Herunterregulation des PTN in U87-Zellen bei Verwendung von 30 pmol bzw. 40 pmol spezifischer PTN-siRNA oder unspezifischer pG12-siRNA, Transfektion mit frischen Komplexen und mit lyophilisierten Komplexen**

Betrachtet man Abb. 4.34, so ist bei allen Ansätzen ein PEI-vermittelter siRNA-Knockdown für die mit der spezifischen PTN-siRNA behandelten Zellen nachweisbar. Mehr als im Northern-Blot kann auch auf Proteinebene von einem PEI-vermittelten Effekt ausgegangen werden. Der siRNA-Knockdown ist ebenfalls bei den Zellen nachweisbar, die mit den lyophilisierten Ansätzen behandelt wurden.

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit sollte das Transfektionsverhalten des durch die Gel-Permeationschromatographie hergestellten verzweigt-kettigen und niedermolekularen Polyethylenimins F25-LMW-PEI charakterisiert werden. Zunächst wurde die DNA-Transfektionseffizienz abhängig von verschiedenen Umgebungsvariablen überprüft, im Anschluss erfolgten Versuche zum siRNA-vermittelten Knockdown. Die Möglichkeit einer Langzeitlagerung nach Lyophilisierung wurde in DNA-Transfektionsversuchen und beim siRNA-vermitteltem Knockdown näher untersucht. Zusätzlich sollte die Auswirkung des PEI/siRNA-vermittelten Targetings der tumorrelevanten Genprodukte PTN und VEGF überprüft werden.

Polyethylenimine wurden erstmals 1995 als vielseitiger Vektor für den Gentransfer *in vivo* und *in vitro* [Boussif et al. (1995)] erwähnt. Die Transfektionseffizienz und die Zytotoxizität der Polyethylenimine wurden in der Vergangenheit abhängig von bestimmten Faktoren beurteilt und untersucht [Pollard et al. (1998)]. Neben dem molekularen Gewicht [Godbey et al. (1999)] sind die PEI-Konzentrationen, das Verhältnis von Stickstoff- zu Nukleinsäureatomen, der Verzweigungsgrad des PEIs, die Pufferkapazität und die kationische Ladungsdichte entscheidend für das Transfektionsverhalten der Polyethylenimine [Fischer et al. (1999), zur Übersicht: Jäger et al. (2012)]. Ebenfalls beeinflussen der DNA-Gehalt des Komplexes, Komplexgröße und Zeta-Potential die Transfektionseigenschaften und die Zytotoxizität [zur Übersicht: Lungwitz et al. (2005)].

In frühen Studien, die zum Transfektionsverhalten der Polyethylenimine veröffentlicht wurden, konnten für High molecular weight Polyethylenimine bessere Transfektionsergebnisse erzielt werden und es wurde postuliert, dass verglichen mit den Low molecular weight PEIs die High molecular weight PEIs kompaktere und stabilere PEI/DNA-Komplexe bilden. So wurde für PEIs von 0,6 bis 70 kDa eine mit dem molekularen Gewicht ansteigende Transfektionseffizienz beschrieben [Godbey et al. (1999)]. Abdallah et al. hingegen zeigten, dass Transfektionen, die mit kleineren 25 kDa PEIs

durchgeführt wurden, bessere Ergebnisse erzielten, als Versuche mit 50 kDa oder 800 kDa PEIs [Abdallah et al. (1996)]. Auch Bieber et al. stellten 2001 dar, dass PEI-Moleküle mit einem kleinerem Molekulargewicht eine gute Transfektionseffizienz mit weniger Zytotoxizität aufweisen [Bieber et al. (2001)]. Die bessere Transfektionseffizienz der Low molecular weight PEIs wird durch eine verbesserte Aufnahme der entstandenen PEI/Nukleinsäure-Komplexe in die Zelle und die leichtere Freisetzung der DNA in das Zytosol erklärt [Kunath et al. (2003), zur Übersicht: Aigner (2006)]. Tatsächlich wird bei Abnahme der Molmasse des PEIs eine Kondensierung der PEI/Nukleinsäure-Komplexe beobachtet [Wightman et al. (2001)], welche dann in vitro in einer gesteigerten Transfektionseffizienz resultiert [Ogris et al. (1998)]. Auf der anderen Seite zeigen PEIs mit einem sehr niedrigem Molekulargewicht (<2 kDa) trotz Verwendung von hohen N/P-Ratios kaum oder keine Transfektionseffizienzen. Es könnte sein, dass eine weitere Abnahme der Molmasse der Low molecular weight Polyethylenimine zu einer verminderten Möglichkeit der Bildung von Polyplexen führt. Daher benötigen LMW-PEIs im Vergleich zu HMW-PEIs höhere N/P-Ratios zur Steigerung der Transfektionseffizienz, da mit einer Erhöhung der N/P-Ratio eine vermehrte Verdichtung der Polyplexe sowie eine Reduzierung der Komplexgröße verbunden ist. Damit kommt es zu einer reduzierten Aggregationstendenz der Polyplexe aufgrund hydrophober Wechselwirkungen und zu einer verbesserten Transfektionseffizienz. Folgend interagieren die unmodifiziert kationischen PEI/siRNA- oder PEI/DNA-Komplexe unspezifisch mit negativ geladenen Glykoproteinen, Proteoglykanen und sulfatierten Proteoglykanen, welche auf der Zellmembran lokalisiert sind [Remy et al. (1998)] und werden dort durch Endozytose in die Zellen aufgenommen. In den Endosomen können sich Protonen an freie N-Atome des PEI anlagern und führen zu einem Nachstrom von  $\text{Cl}^-$  und  $\text{H}_2\text{O}$ . Die Protonenschwammhypothese [Behr (1993)] erklärt die osmotische Schwellung aufgrund des Protoneneinstroms sowie das Platzen der endosomalen Vesikel und damit die Freisetzung der PEI/DNA- oder PEI/siRNA-Komplexe im Zytosol [zur Übersicht: Lungwitz et al. (2005), Aigner (2006)]

Polyethylenimine zeigen bei der Auftrennung durch die Gel-Permeationschromatographie unterschiedliche Laufverhalten entsprechend des



molekularen Gewichts [Godbey et al. (1999)]. Obwohl die verschiedenen käuflich zu erwerbenden PEI-Präparationen mit einem bestimmten Molekulargewicht gekennzeichnet sind, weisen die meisten PEI-Präparationen eine breitere Molekulargewichtsverteilung auf [Bieber et al. (2001)], so dass eine Fraktionierung über die Gel-Permeationschromatographie möglich ist. Auch in dieser Arbeit diente die Gel-Permeationschromatographie mit dem Kunstharz Sephadex<sup>TM</sup> als Säulenmaterial zur Herstellung des Low molecular weight PEIs F25-LMW-PEI mit einem Gewicht von ~ 4 – 10 kDa und mit einer möglichst geringen Zytotoxizität [Werth et al. (2006)]. Die Fraktionen der Gel-Permeationschromatographie wurden in Vorversuchen hinsichtlich ihrer Transfektionseigenschaften untersucht. Die Transfektionen, welche gute Transfektionseffizienzen erbrachten, etwa Fraktion 45 bis Fraktion 80, wurden vereinigt und F25-LMW-PEI genannt. In den hier durchgeführten Experimenten wurde ausschließlich das F25-LMW-PEI verwendet, welches hinsichtlich seiner Transfektionseigenschaften näher untersucht werden sollte.

Trotz der beschriebenen Vorteile der Low molecular weight Polyethylenimine, basierend auf einer hohen Transfektionseffizienz im Zusammenhang mit einer geringeren Zytotoxizität [Fischer et al. (1999)], wurde auch bei den hier durchgeführten Transfektionen mit F25-LMW-PEI festgestellt, dass einige Zellen absterben. Es zeigte sich eine Abhängigkeit der Zytotoxizität von der ansteigenden Komplexmenge des verwendeten F25-LMW-PEI. Trotz der erhöhten Zytotoxizität bei Verwendung größerer Mengen des F25-LMW-PEI konnte mit dem Anstieg der PEI/DNA-Menge jedoch eine höhere DNA-Transfektionseffizienz durch Detektion des Reportergens Luciferase nachgewiesen werden (s. Abb. 4.3). Dass der Einsatz einer erhöhten Polymerkonzentration notwendig ist, um bessere Transfektionseffizienzen zu erzielen, beschrieben Bieber et al. schon 2001 [Bieber et al. (2001)]. Das Verhältnis der Stickstoffatome des PEIs zu den Phosphataten der DNA und damit die Menge des zu verwendenden PEIs für die Polyplex-Bildung wird als N/P-Ratio bezeichnet. Dieses N/P-Verhältnis und damit das Zeta-Potential sind entscheidend für den Gen-Transfer [Lungwitz et al. (2005)]. Bei hohen N/P-Ratios steigt die positive Nettoladung des Komplexes und es kommt zu einer Verbesserung der Zell-Interaktion und zur Verbesserung der zellulären

Aufnahme [Oh et al. (2002)]. Ogris et al. beschrieben eine höhere Verdichtung mit Zunahme des N/P-Verhältnisses, welches zu einer Verminderung der Komplexgröße und zu einer verringerten Neigung der Komplexe zur Aggregation führt [Ogris et al. (1998)]. Diese verminderte Aggregation könnte ebenfalls ein Grund für die steigende Transfektionseffizienz mit Zunahme der Ratio sein. In den eigenen Versuchen zur Optimierung der F25-LMW-PEI-vermittelten DNA-Transfektionseffizienz wurde eine Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der ansteigenden Ratio aufgezeigt (s. Abb. 4.3). Erst ab Verwendung der Ratio 20 oder höher, d.h. ab einem N/P-Verhältnis von 66, konnte die erfolgreiche F25-LMW-PEI-vermittelte DNA-Transfektion durch Detektion der Luciferase-Aktivität nachgewiesen werden. Es fand sich keine direkt proportionale Abhängigkeit der Transfektionseffizienz vom N/P-Verhältnis. Die Gründe hierfür sind ungeklärt. Hinzu kommt, dass man den Anteil der transfizierten Zellen an der Gesamtzellzahl nicht ermitteln kann. Bei einer zu hohen Menge an PEI wurde jedoch auch eine vermehrte Toxizität und das Absterben der transfizierten Zellen nachgewiesen (s. Abb. 4.9). Trotzdem kann der Anteil an abgestorbenen Zellen durch die Verwendung von Polyethylenimin mit niedrigerem molekularem Gewicht, wie F25-LMW-PEI, im Gegensatz zu den Transfektionen mit HMW-PEIs verringert werden [Fischer et al. (1999), Kunath et al. (2003)].

Unabhängig waren die Transfektionseffizienzen davon, ob 150 mM ungepufferte NaCl-Lösung oder der Puffer NaCl-HEPES verwendet wurden. Diese Beobachtungen stimmen überein mit den Untersuchungen von Li et al., die gleichzeitig zeigen konnten, dass für diese Komplexierungsbedingungen höhere Transfektionseffizienzen erzielt werden konnten als für die in 5% Glucose komplexierten Ansätze [Li et al. (2004)]. In den hier durchgeführten Versuchen zur DNA-Transfektionseffizienz des PEIs bei Transfektionen der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3 wurde ebenfalls eine höhere Transfektionseffizienz der in 150 mM NaCl-Lösung oder dem Puffer NaCl-HEPES komplexierten Ansätze dargestellt als für die in 5% Glucose hergestellten Komplexe (s. Abb. 4.3).

Die Inkubationszeit bis zum Medienwechsel, die eine entscheidende Rolle für die Transfektionseffizienz spielt [zur Übersicht Lungwitz et al. (2005)], wurde

wie in Vorversuchen beschrieben konstant bei 1 h belassen. Ebenfalls wurde der pH-Wert der für die Komplexierung verwendeten Lösungen (150 mM NaCl, 5% Glucose oder dem Puffer NaCl-HEPES) konstant bei 7,4 eingestellt. Der pH-Wert der PEI-Lösung vor dem Zusammenführen des PEIs zur DNA scheint jedoch ohnehin keinen entscheidenden Effekt auf die Transfektionseffizienz zu haben [Godbey et al. (1999)].

Während Polyethylenimine als Goldstandard für den Plasmid-DNA-Transfer gelten, war die Polyplexbildung von Polyethylenimininen und siRNAs und die Untersuchung hinsichtlich eines Gen-Silencings bislang weniger untersucht worden [Hassani et al. (2005), Grayson et al. (2006), zur Übersicht: Singha et al. (2011)]

SiRNAs sind von bedeutendem Interesse zur sequenzspezifischen Herunterregulation von Genen, d.h. bei der Inhibition der Genexpression [Fire et al. (1998)]. Nach der Entdeckung der RNA-Interferenz durch Fire, Mello und Kollegen folgten bald Experimente der Tuschl-Gruppe, in denen durch Anwendung von synthetischen siRNA die sequenzspezifische Herunterregulation von endogenen und heterologen Genen in Säugetierzellen erfolgte [Elbashir et al. (2001)]. Durch diese Entdeckung wurde die Forschung auf die Entwicklung von small interfering RNAs als therapeutische Maßnahme für das Gen-Silencing fokussiert. Aufgrund des hohen Molekulargewichts (~ 13 kDa), der polyanionischen Natur (~ 40 negative Phosphatgruppen) und dem schnellen enzymatischen Abbau der siRNAs zeigte sich jedoch eine Problematik hinsichtlich der Einschleusung der siRNA in das Cytosol. Unter den verschiedenen Gentransfer-Vektoren rückten Vektoren wie das Polyethylenimin aufgrund ihrer hohen Transfektionseffizienz in den Fokus und wurden für den siRNA-vermittelten Knockdown näher untersucht [Nimesh (2012)].

Die RNA-Interferenz und damit der Knockdown eines spezifischen Gens werden durch 21-23 nt doppelsträngige siRNA-Moleküle vermittelt [Bernstein et al. (2001), Zamore et al. (2000)]. Das Problem bei der Verwendung von RNA-Molekülen ist die Instabilität der RNA und die schnelle Degradation durch Ribonukleasen. Es wurde jedoch gezeigt, dass bei der Komplexierung der siRNA mit PEI prinzipiell ein Schutz von RNA-Molekülen erzielt werden kann

[Aigner et al. (2002), Brus et al. (2004)b, zur Übersicht: Günther et al. (2011)]. Die Komplexierungen mit kurzen Polynukleotiden (wie siRNA) gelten allgemein als schwierig, da sie durch ihre limitierte Zahl an negativen Ladungen unzureichend für kooperative Bindungen sind. Interpolyelektrolytkomplexe sind häufig in Lösung weniger stabil und dies führt zu einer schnellen Aggregation [Kabanov et al. (1998)]. Nur Komplexe mit vollständig komplexierten und kondensierten Nukleinsäuren sind gegen enzymatischen Angriff und Abbau stabilisiert [Fischer et al (2005)].

Folgend sollte in den Versuchen eine durch F25-LMW-PEI-vermittelte Transfektion von siRNA-Molekülen und die Möglichkeit des spezifischen Genknockdowns untersucht werden. Hierzu wurden transiente Co-Transfektionen von Luciferase-exprimierender Plasmid-DNA und Luciferase-spezifischer siRNA pGI3 durchgeführt, um eine F25-LMW-PEI-vermittelte Herunterregulation der Luciferase und somit einen siRNA-vermittelten Knockdown aufzuzeigen. In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass F25-LMW-PEI in der Lage ist, die siRNA zu komplexieren und somit vor Degradation zu schützen. Indirekt wurde dies durch das PEI/siRNA-vermittelte Gen-Silencing aufgezeigt, welches durch eine verminderte Luciferase-Aktivität bei den transienten Co-Transfektionen von DNA und spezifischer pGI3-siRNA dargestellt wurde (s. Abb. 4.4). Hier konnte eine Herunterregulation der Luciferase-Aktivität von 75% nach 48h nachgewiesen werden (s. Abb. 4.5). Insgesamt wiesen die SKOV-3-Zellen, die mit den in 150 mM NaCl oder in dem Puffer NaCl-HEPES komplexierten Ansätzen transfiziert worden waren, höhere absolute Luciferase-Aktivitäten (in RLU) auf als die Zellen, die mit den in 5% Glucose komplexierten Ansätzen transfiziert worden waren. Diese Ergebnisse entsprachen denen, die Li et al. in Bezug auf die DNA-Transfektionseffizienz beschrieben hatten, und zeigten ferner auch, dass sowohl bei der Verwendung von 150 mM NaCl-Lösung als auch dem Puffer NaCl-HEPES bessere Ergebnisse bezüglich des siRNA-Knockdowns bei PEI-vermittelten DNA/siRNA-Co-Transfektionen der SKOV-3-Zellen erzielt werden konnten als bei Verwendung von 5 % Glucose [Li et al. (2004)]. Ebenso wie für die DNA-Transfektionseffizienz wurde auch bei einem direkten Vergleich des siRNA-vermittelten Knockdowns nach Komplexierung in 150 mM NaCl oder dem Puffer NaCl-HEPES dargestellt, dass sowohl 150 mM NaCl als auch der Puffer

gleichwertig zum siRNA-vermitteltem Knockdown eingesetzt werden können (s. Abb. 4.6).

In den weiteren Versuchen zur Charakterisierung der Abhängigkeit des PEI/siRNA-vermittelten Knockdowns von Ratio und Puffer wurden stabil Luciferase-exprimierende SKOV3-10-Zellen verwendet. Die Herunterregulation der Luciferase-Aktivität würde einem siRNA-vermittelten Knockdown entsprechen. Für die Komplexierung wurden entweder 5% Glucose, 150 mM NaCl oder der Puffer NaCl-HEPES genutzt. Bei diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die mit spezifischer pGI3-siRNA und F25-LMW-PEI transfizierten stabil Luciferase-exprimierenden SKOV3-10-Zellen eine Herunterregulation der Luciferase-Aktivität aufwiesen im Gegensatz zu den SKOV3-10-Zellen, die mit der unspezifischen pGI2-siRNA transfiziert wurden (s. Abb. 4.10). Es konnte hiermit also gezeigt werden, dass bei der Anwendung des F25-LMW-PEI zum siRNA-Gentransfer ein Gen-Silencing eines stabil transfizierten Genproduktes möglich ist. Im Gegensatz zu den transienten Co-Transfektionen konnte nach 72 h kein wesentlicher Unterschied für eine Komplexierung in 5% Glucose, 150 mM NaCl oder dem Puffer NaCl-HEPES festgestellt werden. Der erbrachte Nachweis für den siRNA-vermittelten Knockdown bei den SKOV-3-10-Zellen war in diesen Versuchen also unabhängig vom Puffer (s. Abb. 4.13 und Abb. 4.14).

Bei der Komplexierung von Nukleinsäuren und nicht-viralen Vektoren ist die Stabilität der Komplexe zeitlich begrenzt, so dass die Komplexe direkt vor der Transfektion hergestellt werden sollten [Anchordoquy et al. (2000), Felgner et al. (1995)]. Ein Verlust der Transfektionseffizienz ist durch die Aggregation der Komplexe mit der Zeit [Talsma et al. (1997)] und der damit verbundenen Zunahme der Komplexgröße [Zelphati et al (1998), Höbel et al. (2008)] zu erklären. Diese Erkenntnisse entsprechen auch den hier beobachteten Ergebnissen nach Lagerung der Komplexe für 10 d bei 4°C. In Kapitel 4.13 wurde eine Langzeitlagerung der Komplexe in Lösung (d.h. in dem Puffer NaCl-HEPES oder 5% Glucose) oder nach Lyophilisierung untersucht und nach einer 10-tägigen Lagerung der Komplexe eindeutig ein Wirkverlust hinsichtlich des siRNA-Knockdowns bei den in Lösung befindlichen Komplexen dargestellt (s.

Abb. 4.26). Bei den Zellen, die mit den zuvor lyophilisierten Komplexen transfiziert wurden, konnte auch nach längerer Lagerung der Komplexe eine deutliche siRNA-vermittelte Herunterregulation beobachtet werden.

Die Lyophilisierung ist somit ein Verfahren zur langfristigen Lagerung von PEI/Nukleinsäure-Komplexen bei Raumtemperatur [Allison et al. (2000), Molina et al. (2001), Kasper et al. (2013)]. 1997 wurde gezeigt, dass Plasmid-DNA, komplexiert mit Transferrin-konjugiertem 800 kDa-PEI, lyophilisiert werden kann, ohne dass die biologische Aktivität vermindert wird [Talsma et al. (1997)]. Während der Lyophilisierung werden stabile PEI-Nukleinsäure-Komplexe gebildet, deren Qualität nach Rehydratation erhalten bleibt. Brus et. al. zeigten, dass die Lyophilisierung eine mögliche Technik zur Produktion stabiler PEI-Nukleinsäure- sowie PEI-Ribozym-Komplexe ist, welche zur Lagerung geeignet sind. Es wurde jedoch ohne Zusatz eines Lyoprotektors eine Verminderung der Transfektionseffizienz für die PEI/Plasmid-DNA-Komplexe nach Lyophilisierung beschrieben. Durch Hinzufügen von z.B. Mannitol, Trehalose oder Sucrose als Lyoprotektor konnte nach Lyophilisierung der Komplexe eine ähnliche Transfektionseffizienz erreicht werden wie für die Transfektion mit frischen Komplexen [Brus et al. (2004)a].

In den eigenen Versuchen wurde kein Lyoprotektor eingesetzt, um gesondert die Möglichkeit der Kryokonservierung der mit dem F25-LMW-PEI hergestellten PEI/DNA- bzw. PEI/siRNA/DNA-Komplexen zu untersuchen. Anzumerken ist hinsichtlich der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Lyophilisierung, dass die Komplexe nicht eingefroren, sondern im flüssigen Zustand unter Vakuum eingetrocknet wurden. Nach Lyophilisierung der hergestellten PEI/siRNA/DNA-Komplexe konnte wie erwartet eine F25-LMW-PEI-vermittelte DNA-Transfektionseffizienz bei Co-Transfektionen der SKOV3-Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 4.7). Im Gegensatz zu den Transfektionen mit frischen Komplexen (s. Abb. 4.4) wurde bei den Zellen, die mit den lyophilisierten und in 5% Glucose hergestellten Komplexen transfiziert worden waren, eine höhere Transfektionseffizienz hinsichtlich der F25-LMW-PEI-vermittelten DNA-Transfektion detektiert. Ähnlich wurde in vorherigen Studien beschrieben, dass die Komplexbildung der PEI/siRNA/DNA-Komplexe in 5% Glucose anstatt in 150 mM NaCl zu kleineren Komplexgrößen führt [zur Übersicht: Neu et al. (2005)],

welches wiederum mit einer erhöhten Transfektionseffizienz verbunden ist [Ogris et al. (1998)]. Auch nach Lyophilisierung der F25-LMW-PEI/siRNA/DNA-Komplexe war der siRNA-vermittelte Knockdown durch Herunterregulation der Luciferase-Aktivität in den SKOV-3-Zellen nachweisbar (s. Abb. 4.8). Bei den Transfektionen der stabil-Luciferase-exprimierenden SKOV3-10-Zellen mit lyophilisierten Komplexen war hier für die in 5% Glucose zubereiteten Komplexe eine bessere Herunterregulation der Luciferase-Aktivität nachzuweisen (s. Abb. 4.17).

Die Lyophilisierung von PEI/siRNA/DNA-Komplexen ist eine gute Möglichkeit zur Langzeitlagerung von Komplexen. Eine direkte Lyophilisierung in 24-Well-Platten wurde in den Versuchen unter Abschnitt 4.9 untersucht und ergab, dass die in den 24-Well-Platten lyophilisierten Ansätze, die in 5% Glucose komplexiert wurden, gute Ergebnisse mit einer Herunterregulation von ca. 75% nach 96 h aufwiesen. So könnten z.B. Ready-to-use-Platten zu Screening-Zwecken und medizinische Gentherapie-Produkte hergestellt werden, die für den Benutzer mit einem verminderten Arbeitsaufwand verbunden wären.

Höbel et al. beschrieben 2008 ebenfalls die Möglichkeit der Lagerung der PEI/siRNA/DNA-Komplexe bei -20°C ohne Verlust der DNA- oder siRNA-Transfektionseffizienz. F25-LMW-PEI-basierte Komplexe mit DNA und/oder siRNA, ohne chemische Modifikationen und in 0,9% NaCl-Lösung gefertigt, konnten mit Beibehaltung ihrer Transfektionseffizienz eingefroren und bis zu 3 Monate gelagert werden. Es wurde hiermit die bequeme Möglichkeit einer Langzeitlagerung von F25-LMW-PEI/siRNA/DNA-Komplexen für mehrere Monate dargestellt, die Verwendung von Lyoprotektoren war nicht notwendig [Höbel et al. (2008)]. Aufgrund der Möglichkeit des Einfrierens der PEI/siRNA/DNA-Komplexe, bei der das siRNA-basierte Gen-Silencing komplett erhalten wurde, bietet diese Methode Vorteile gegenüber der Lyophilisierung, die mit einem höheren logistischen Aufwand verbunden ist. Bei den lyophilisierten Komplexen konnte in den unter Abb. 4.26 gezeigten Ergebnissen eine Abschwächung der Knockdown-Effizienz im Gegensatz zu den Zellen aufgezeigt werden, die mit frischen Komplexen behandelt wurden. So ist die Methode des Einfrierens der Lyophilisierung hinsichtlich der Wirkeffizienz der DNA-Transfektion und des Gen-Silencings überlegen. Die Lyophilisierung gestattet jedoch die Lagerung der Komplexe bei Raumtemperatur und könnte

durch Anwendung von Lyoprotektoren noch weiter optimiert werden. Ebenfalls die Verbesserung der Technik des Einfrierens während der Lyophilisierung könnte weiter in den Fokus rücken und wäre ein entscheidender Parameter zur Optimierung der Transfektionseffizienz und eines evtl. Gen-Silencings [Kasper et al. (2011)].

Die durch F25-LMW-PEI-vermittelte Transfektionseffizienz und der siRNA-vermittelte Gen-Knockdown sowie die Möglichkeit der Lyophilisierung wurden durch die Versuche mit dem Reporter-Gen Luciferase an den co-transfizierten SKOV-3 Zellen und den stabil Luciferase-produzierenden SKOV-3-10-Zellen gut belegt, so dass folgend die Auswirkung des PEI-vermittelten Targetings eines tumorrelevanten Genproduktes durch siRNA untersucht werden sollte. Hierzu wurden die Prostatakarzinomzelllinie PC3 sowie die Glioblastomzelllinie U87 verwendet.

Die Prostatakarzinomzellen PC3 exprimieren den wichtigen Angiogenese-Faktor VEGF (vascular endothelial growth factor) [Kambhampati et al. (2005)], welcher vermehrt beim Tumorwachstum, der damit verbundenen Angiogenese und bei der Metastasierung nachgewiesen wird [Perez-Pinera et al. (2008), Bautch (2012)]. Die Inhibition von VEGF oder des VEGF-Rezeptors vermindern daher Tumorwachstum und Metastasierung in vitro und in vivo [Kim et al. (1993), Höbel et al. (2010)]. Somit wurde versucht, die VEGF- bzw. VEGF-Rezeptor-vermittelte Signalkaskade näher zu untersuchen und eine Blockade entweder durch humane VEGF-Antikörper oder durch VEGF-siRNA zu erreichen. Bevacizumab (Avastin®) ist ein humaner Anti-VEGF-Antikörper, welcher als erster VEGF-Antikörper in der Karzinom-Therapie zugelassen wurde [zur Übersicht: Kamba et al. (2007)] und in einer Kombination mit einer Chemotherapie auf Fluorpyrimidin-Basis zur Behandlung von Patienten mit metastasiertem Kolon- oder Rektumkarzinom angewendet wird [zur Übersicht: Chibaudel et al. (2012)]. Ebenfalls als First-Line Behandlung wird Bevacizumab in Kombination mit anderen Chemotherapeutika bei Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom, bei fortgeschrittenem nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom, bei fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom, bei fortgeschrittenem epitheliale Ovarialkarzinom oder primärem



Peritonealkarzinom in den FIGO-Stadien IIIB, IIIC und IV angewendet [zur Übersicht: Braghiroli et al. (2012)].

In dieser Arbeit wurde durch F25-LMW-PEI-VEGF-siRNA-vermitteltes VEGF-Targeting ein vermindertes Wachstum der hochaggressiven PC3-Zellen nachgewiesen. Das verminderte PC3-Zellwachstum wurde in einem Wachstumsassay wie dem WST-Assay dargestellt. Dort zeigte sich außerdem, dass ein Wachstum der PC3-Zellen ohne Zusatz von mind. 2% FCS im IMDM-Medium nicht möglich ist (s. Abb. 4.27). Höbel et al. beschrieben darauf aufbauend die PEI/siRNA-vermittelte Herunterregulation von VEGF in vivo. Toxizitätsstudien zeigten hierbei keine vermehrte Hepatotoxizität oder einen Anstieg der proinflammatorischen Zytokine durch die Applikation von F25-LMW-PEI/siRNA-Komplexen [Höbel et al. (2010)].

Um die Herunterregulation eines weiteren relevanten Genproduktes zu untersuchen, wurde die Glioblastomzelllinie U87 ausgewählt. U87-Zellen exprimieren den Heparin-bindenden Wachstumsfaktor PTN, welcher vermehrt bei bösartigen Erkrankungen [Czubayko et al. (1996), Perez-Pinera et al. (2007), Papadimitriou et al. (2009)] und bei akuten sowie chronischen Entzündungen [Weckbach et al. (2012)] nachzuweisen ist. Die protoonkogene Wirkung des PTN-Gens beruht hauptsächlich auf der Stimulation der Proliferation von Tumorzellen und der Angiogenese und basiert auf einer vermehrten Expression des PTN [Deuel et al. (2002)]. Auch bei den U87-Zellen konnte im WST-Proliferationsassay ein vermindertes Wachstum der mit der spezifischen PTN-siRNA transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Zellen, die nicht mit den F25-LMW-PEI/siRNA-Komplexen behandelt wurden, im Vergleich zu den transfizierten Zellen ein vermehrtes Wachstum aufwiesen, welches für die Toxizität des PEIs an sich sprechen könnte (s. Abb. 4.29).

Um die Möglichkeit der Lagerung der F25-LMW-PEI/siRNA-Komplexe zu untersuchen, erfolgte das PEI-vermittelte PTN-Targeting nach Lyophilisierung der Komplexe. Hier konnte ebenfalls ein vermindertes Zellwachstum der mit der spezifischen PTN-siRNA behandelten Zellen beobachtet und die antiproliferative Wirkung des F25-LMW-PEI/siRNA-vermittelten Gentargetings dargestellt werden. Der Nachweis der PTN-Reduktion wurde weiterhin auf

mRNA-Ebene durch Northern-Blots untersucht. Auch hier konnte eine Herunterregulation des PTN-mRNA-Gehaltes nachgewiesen werden, welches für ein effizientes Gentargeting spricht.

Auf Protein-Ebene erfolgte der Nachweis der PTN-Herunterregulation über PTN-ELISAs. Grzelinski et al. beschrieben das siRNA-basierte Gentargeting des sekretierten Wachstumsfaktors PTN unter Verwendung des Jet-PEIs. Dort wurde gezeigt, dass die Komplexierung von siRNAs mit dem kommerziell erhältlichen Jet-PEI zur Bildung von Komplexen führt, welche bei Beobachtung durch die Rasterkraftfeldmikroskopie eine Kondensierung und somit den Schutz der mit PEI komplexierten siRNA aufweisen. Nach Aufnahme der PEI/siRNA-Komplexe in die U87-Glioblastomzellen konnte eine PTN-Herunterregulation in den U87-Zellen sowie eine reduzierte Proliferation durch die verminderte Soft-Agar-Kolonie-Bildung beobachtet werden [Grzelinski et al. (2005)]. In den eigenen Versuchen konnte der siRNA-vermittelte Genknockdown ebenfalls durch den verminderten PTN-Nachweis im Medium-Überstand durch den PTN-ELISA dargestellt werden (s. Abb. 4.34). Da bei der Durchführung des PTN-ELISAs die Mediumüberstände nach Transfektion der U87-Zellen sowohl mit frischen als auch mit lyophilisierten PEI/PTN- oder PEI/pGI2-siRNA-Komplexen verwendet und verglichen wurden, konnte auch hier die Möglichkeit der Lyophilisierung aufgezeigt werden. Unterschieden werden muss bei den Versuchen die Menge der verwendeten siRNA (30 pmol versus 40 pmol), da auffallend ist, dass die Zellen, die mit der größeren siRNA-Menge transfiziert wurden, weniger PTN in das Serum sekretieren. Da bei den verschiedenen Versuchen die F25-LMW-PEI/siRNA-Ratio konstant war und mit steigender Menge des siRNAs auch die PEI-Menge zunahm, kann man hier den oben beschriebenen zytotoxischen Effekt des PEIs als Erklärung vorweisen.

Auch die Auswirkung des F25-LMW-PEI-vermittelten Targetings auf ein tumorrelevantes Genprodukt wie VEGF und PTN konnte in den beschriebenen Versuchen aufgezeigt werden, so dass sich auch in Zukunft ein Trend zu den Low molecular weight Polyethylenimininen für den in vivo und in vitro Gebrauch ergibt, da sie eine vergleichsweise gute Biokompatibilität und eine geringere Zytotoxizität bei der Transfektion größerer Mengen von PEI/DNA-Komplexen zeigen [Fischer et al. (1999), Werth et al. (2006)]. Vor

allen die schlechte Prognose für Patienten mit fortgeschrittenen Karzinomen z.B. des Kolons und Rektums, der Niere, Mamma, Pankreas oder des Ovars bedingt eine weitere Forschung hinsichtlich neuer therapeutischer Strategien. In Kombination mit anderen Chemotherapeutika könnte neben dem bereits verwendeten VEGF-Antikörper Bevacizumab eine siRNA-spezifische Therapie mit Proliferationshemmung der Tumorzellen bzw. Antiangiogenese erfolgen.

## 6 Zusammenfassung

RNA Interferenz ist ein natürlicher Prozess in eukaryoten Zellen, der zur spezifischen Herunterregulation der Genexpression (Gen-Silencing) führt. Der Mechanismus der RNAi wird durch 21 - 23 nt lange doppelsträngige RNA-Moleküle (siRNA) vermittelt, welche sequenzspezifisch den Abbau und die Degradation ihrer Ziel-mRNA herbeiführen, indem sie den RISC-Komplex im Zytosol zu seiner Ziel-mRNA dirigieren. Ein Kriterium bei der Transfektion der Zellen mit siRNA ist der schnelle Abbau der Nukleinsäuren durch Ribonukleasen und damit eine verminderte Transfektionseffizienz.

Polyethylenimine sind synthetische Polymere, die in verschiedenen Molmassen vorliegen und die eine hohe kationische Ladungsdichte aufweisen. Aufgrund dieser Protonierung sind sie in der Lage, Komplexe mit siRNA oder DNA zu bilden. Als positiv geladene Polyplexe interagieren sie dann mit der Zellmembran und werden per Endozytose in das Zytosol aufgenommen. Die Pufferkapazität der Polyethylenimine ermöglicht das Verlassen der Lysosomen nach deren Platzen (Protonenschwammhypothese) und schützt die Nukleinsäuren vor der Degradation.

In dieser Arbeit wurde die gelpermeationschromatographische Trennung der Lösung eines verzweigten 25-kDa-Polyethylenimins zur Herstellung eines Low molecular weight Polyethylenimins genutzt. Dieses als F25-LMW-PEI bezeichnete Polyethylenimin zeigte eine verbesserte Transfektionseffizienz sowie eine geringere Zytotoxizität, die bei Transfektionsversuchen mit den Zelllinien SKOV3, U87 und PC3 näher untersucht wurden. Hier konnten bei Co-Transfektionen mit DNA hervorragende Transfektionseigenschaften nachgewiesen werden. Gleichfalls war die durch siRNA vermittelte Herunterregulation der Luciferase bei stabil Luciferase-exprimierenden SKOV3-10-Zellen unter verschiedenen Transfektionsbedingungen eindeutig nachweisbar. Auch nach Lyophilisierung und Resolubilisierung der PEI/siRNA/DNA-Komplexe konnte ein Genknockdown durch RNAi beobachtet werden.

Zur weiteren Charakterisierung des F25-LMW-PEI-vermittelten siRNA-Targetings tumorrelevanter Genprodukte wurden die Prostatakarzinomzelllinie PC3 sowie die Glioblastomzelllinie U87 verwendet. Die Prostatakarzinomzellen

PC3 exprimieren den wichtigen Angiogenese-Faktor VEGF, welcher vermehrt beim Tumorwachstum und der damit verbundenen Angiogenese nachgewiesen wird. Eine Vielzahl von Krebsarten geht mit einer erhöhten VEGF-mRNA-Expression einher. Die Möglichkeit des wirkungsvollen siRNA-Targetings und des Knockdowns wurde durch ein vermindertes PC3-Zellwachstum im WST-Assay dargestellt.

U87-Zellen exprimieren den Heparin-bindenden Wachstumsfaktor Pleiotrophin (PTN), welcher vermehrt bei bösartigen Erkrankungen gefunden wird. Die protoonkogene Wirkung des PTN-Gens beruht hauptsächlich auf der Stimulation der Proliferation von Tumorzellen und der Angiogenese. Bei den U87-Zellen konnte bei den mit der spezifischen PTN-siRNA transfizierten Zellen eine PTN-Herunterregulation auf mRNA- und Protein-Ebene nachgewiesen werden, was zu einer verminderten Zellproliferation führte.

Die Möglichkeit der Lyophilisierung der F25-LMW-PEI/siRNA-Komplexe war auch bei Transfektion der PC3- sowie der U87-Zellen eindeutig nachweisbar und es zeigten sich nach der Transfektion mit den spezifischen siRNAs ein vermindertes Zellwachstum der malignen Zellen sowie eine verminderte Konzentration von PTN auf Proteinebene.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AGO1/2	Argonaut 1/2
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
Ang-1, Ang-2	Angiopoietine 1, 2
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	complementary DNA
d	Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dsRNA	doppelsträngige RNA
E. coli	Escherichia coli
ECM	extrazellulären Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$
HMW-PEI	High molecular weight PEI
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IP-10	Interferon gamma inducible protein 10
kbp	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilodalton (atomare Maßeinheit)
LB-Medium	Luria Broth-Medium
LMW-PEI	Low molecular weight PEI
min	Minute
mM	Stoffmengenkonzentration mmol/l
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA
N/P-Verhältnis	Verhältnis der PEI-Aminostickstoffe zu Nukleinsäure-Phosphaten
NF $\kappa$ B	nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells (spezifischer Transkriptionsfaktor)
Nt	Nukleotid(e)
PAZ	PIWI/Argonat/Zwille, Pinhead-Domain
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC3	Humane nicht androgen-sensitive Prostatakarzinomzelllinie
PD-ECGF/TP	Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase
PDGF	Platelet-derived growth factor

PEI	Polyethylenimine
pGI2	Luciferase-siRNA
pGI3	Luciferase-siRNA
PIGF	Placental growth factor
pRc-CMV-DNA	DNA-Plasmid pRc-CMV
PTN	Pleiotrophin
RISC	RNA-induced silencing complex
RLU	Relative Light Units
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sec	Sekunde
siRNA	Small interfering RNA
SKOV3	Humane Ovarialkarzinomzelllinie
SKOV3-10	Stabil Luciferase exprimierende humane Ovarialkarzinomzelllinie
SSC	Standard Saline Citrate
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline/Tween 20
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
TRBP	transactivating response RNA-binding protein
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U87	humane Glioblastomzelllinie
UV	Ultraviolett (-Strahlung)
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR-1	VEGF-Rezeptor 1
WST-1	water soluble tetrazolium (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat)q

## 8 Literaturverzeichnis

### **[Abdallah et al. (1996)]**

Abdallah, B, Hassan, A, Benoist, C, Goula, D, Behr, JP, Demeinex, BA (1996) "A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: Polyethylenimine" *Hum Gene Ther* 7(16):1947-1954

### **[Aigner et al. (2002)]**

Aigner, A., Fischer, D., Merdan, T., et al. (2002) "Delivery of unmodified bioactive ribozymes by an RNA-stabilizing polyethylenimine (LMW-PEI) efficiently down-regulates gene expression." *Gene Therapy* (2002) 0, 1-8

### **[Aigner et al. (2003)]**

Aigner, A., Brachmann, P., Beyer, J., Jäger, R., Raulais, D., Vigny, M., Neubauer, A., Heidenreich, A., Weinknecht, S., Czubayko, F. und Zugmaier, G. (2003) „Marked increase of the growth factors pleiotrophin and fibroblast growth factor-2 in serum of testicular cancer patients" *Ann Oncol* (2003) 14 (10): 1525-1529.

### **[Aigner (2006)]**

Aigner, A. (2006) "Delivery systems for the direct application of siRNAs to induce RNA interference (RNAi) in vivo" *J Biomed Biotechnol.*;2006(4):71659.

### **[Allison et al. (2000)]**

Allison S. D., Molina M. C., Anchordoquy T. J. Stabilization of lipid/DNA complexes during the freezing step of the lyophilization process: the particle isolation hypothesis. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1468(1–2):127–138.

### **[Arenz et al. (2003)]**

Arenz C., Schepers U. „RNA interference: from an ancient mechanism to a state of the art therapeutic application?" *Naturwissenschaften*. 2003 Aug; 90(8):345-59. Epub 2003 Jul 23

### **[Anchordoquy et al. (2000)]**

Anchordoquy, T. J., Koe, G. S. "Physical stability of nonviral plasmid-based therapeutics" *J Pharm Sci*. 2000 Mar;89(3):289-96.

### **[Ausubel et al. (1998)]**

Ausubel, F. M. et al., "Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley & Sons Verlag (1998).

### **[Bartel (2004)]**

Bartel, D. P. "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function" *Cell*, 116 (2), 281–297

### **[Bautch (2012)]**

Bautch, V. L. "VEGF-directed blood vessel patterning: from cells to organism" *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Sep 1;2(9):a006452



**[Behr (1993)]**

Behr, J. P. "The proton sponge: a trick to enter cells the viruses did not exploit" CHIMIA International Journal for Chemistry, Volume 51, Numbers 1-2, January/February 1997, pp. 34-36(3)

**[Bernstein et al. (2001)]**

Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., Hannon, G. J. (2001) "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference" Nature, Vol. 409 (6818): 363-366

**[Bieber et al. (2001)]**

Bieber, T., Elsässer, H. P. (2001) "Preparation of a low Molecular Weight Polyethylenimine for Efficient Cell Transfection" BioTechniques 30(1): 74-81

**[Bloomfield (1996)]**

Bloomfield, V. A. (1996) "DNA condensation" Curr Opin Struct Biol 1996; 6: 334-341

**[Boeckle et al. (2004)]**

Boeckle, S., von Gersdorff, K., van der Piepen, S., Culmsee, C., Wagner, E., Ogris, M. (2004) "Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer" J Gene Med. 2004 Oct;6(10):1102-11.

**[Bologna et al. (2003)]**

Bologna, J. C., Dorn, G., Natt, F., Weiler, J. (2003) "Linear Polyethylenimine as a Tool for Comparative Studies of Antisense and Short Double-Stranded RNA Oligonucleotides" Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, Vol. 22, Nos. 5-8, 1729-1731

**[Bootle-Wilbraham et al. (2001)]**

Bootle-Wilbraham, C. A., Tazzyman, S., Thompson W. D., Stirk C. M., Lewis C. E. "Fibrin fragment E stimulates the proliferation, migration and differentiation of human microvascular endothelial cells in vitro" Angiogenesis 4 (2001), pp. 269-275

**[Boussif et al. (1995)]**

Boussif, O., Lezoulch, F., Zanta, M. A., et al. (1995) "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 92, 7297-7301, August 1995

**[Braghiroli et al. (2012)]**

Braghiroli, M. I., Sabbaga, J., Hoff, P. M. "Bevacizumab: overview of the literature" Expert Rev Anticancer Ther. 2012 May;12(5):567-80

**[Brekken et al. (1998)]**

Brekken, R. A., Huang, X., King, S.W. and Thorpe, P. E. "Vascular endothelial growth factor as a marker of tumor endothelium" Cancer Res., 58: 1952-1959, 1998.

**[Brus et al. (2004)a]**

Brus C., Kleemann, E., Aigner, A., et al. "Stabilization of oligonucleotide-polyethylenimine complexes by freeze-drying: physicochemical and biological characterization" *Journal of Controlled Release* 95 (2004) 119-131

**[Brus et al. (2004)b]**

Brus C., Petersen, H., Aigner, A., Czubayko, F., Kissel, T. "Physicochemical and Biological Characterization of Polyethylenimine-graft-Poly(ethylene glycol) Block Copolymers as a Delivery System for Oligonucleotides and Ribozymes." *Bioconjugate Chem* 2004, 15, 677-684

**[Carmell et al. (2002)]**

Carmell, M. A., Xuan, Z., Zhang, M. Q. and Hannon, G. J. "The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis" *Genes Dev* 16, 2733-42 (2002).

**[Chang et al. (2007)]**

Chang, Y., Zuka, M., Perez-Pinera, P., Astudillo, A., Mortimer, J., Berenson, J. R., Deuel, T. F. "Secretion of pleiotrophin stimulates breast cancer progression through remodeling of the tumor microenvironment" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jun 26;104(26):10888-93

**[Check (2002)]**

Check, E. "A tragic setback" *Nature* 2002; 420 (6912): 116-118

**[Chibaudel et al. (2012)]**

Chibaudel, B., Tournigand, C., André, T., de Gramont, A. "Therapeutic strategy in unresectable metastatic colorectal cancer" *Ther Adv Med Oncol*. 2012 Mar;4(2):75-89.

**[Czubayko et al. (1996)]**

Czubayko, F., Schulte, A. M., Berchem, G. J., Wellstein, A. "Melanoma angiogenesis and metastasis modulated by ribozyme targeting of the secreted growth factor pleiotrophin" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 14753-14758 (1996)

**[Demeneix et al. (2004)]**

Demeneix, B., Hassani, Z., Behr, J. P. (2004) "Towards Multifunctional Synthetic Vectors" *Current Gene Therapy*, 2004, 4, 445-455

**[Deuel et al. (2002)]**

Deuel T. F., Zhang N., Yeh H. J., Silos-Santiago I., Wang Z. Y. "Pleiotrophin: a cytokine with diverse functions and a novel signaling pathway" *Arch Biochem Biophys*. 2002 Jan 15;397(2):162-71.

**[Diamantopoulou et al. (2010)]**

Diamantopoulou, Z., Bermek, O., Polykratis, A., Hamma-Kourbali, Y., Delbé, J., Courty, J. und Katsoris, P. "A Pleiotrophin C-terminus peptide induces anti-cancer effects through RPTP $\beta/\zeta$ " *Molecular Cancer* 2010, 9:224

**[Dillin (2003)]**

Dillin, A. "The specifics of small interfering RNA specificity" *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 May 27;100(11):6289-91

**[Dvorak et al. (1995)]**

Dvorak, H. F., Brown, L.F., Detmar, M., Dvorak, A. M. "Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis" *Am J Pathol*. 1995 May;146(5):1029-39

**[Edelstein et al. (2007)]**

Edelstein, M. L., Abedi, M. R., Wixon, J. „Gene therapy clinical trials worldwide to 2007-an update" *J Gene Med*. 2007 Oct;9(10):833-42

**[Elbashir et al. (2001)]**

Elbashir, S. M., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2001) "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs" *Genes and Development* 15: 188-200

**[Escudier et al. (2007)]**

Escudier, B., Pluzanska, A., Koralewski, P., Ravaud, A., Bracarda, S., Szczylik, C., Chevreau, C., Filipek, M., Melichar, B., Bajetta, E., Gorbunova, V., Bay, J. O., Bodrogi, I., Jagiello-Gruszfeld, A., Moore, N.; AVOREN Trial investigators "Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial" *Lancet*. 2007 Dec 22;370(9605):2103-11.

**[Fang et al. (1992)]**

Fang, W., Hartmann, N., Chow, D. T., Riegel, A. T., Wellstein, A. "Pleiotrophin stimulates fibroblasts and endothelial and epithelial cells and is expressed in human cancer" *J Biol Chem*. 1992 Dec 25;267(36):25889-97

**[Feghhi et al. (2011)]**

Feghhi M, Nikzamir A, Esteghamati A et al. Relationship of vascular endothelial growth factor (VEGF) +405 G/C polymorphism and proliferative retinopathy in patients with type 2 diabetes. *Transl Res* 2011; 158: 85–91.

**[Felgner et al. (1995)]**

Felgner P. L., Tsai Y. J., Sukhu L., et al. „Improved cationic lipid formulations for in vivo gene therapy" *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1995;772:126–139

**[Feng et al. (2010)]**

Feng, Z. J., Gao, S. B., Wu, Y., Xu, X. F., Hua, X., Jin, G. H. "Lung cancer cell migration is regulated via repressing growth factor PTN/RPTP  $\beta/\zeta$  signaling by menin" *Oncogene*. 2010 Sep 30;29(39):5416-26. Epub 2010 Jul 19.

**[Ferrara et al. (2003)]**

Ferrara, N., Gerber, H.P., LeCouter J. "The biology of VEGF and its receptors" *Nat Med*. 9 (2003), 669–676

**[Ferrara (2004)]**

Ferrara, N. "Vascular endothelial growth factor, basic science and clinical progress" *Endocr. Rev*. 25 (2004), pp. 581-611

**[Fire et al. (1998)]**

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K. (1998) "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*" *Nature*, Vol 391 (6669): 806-811

**[Fischer et al. (1999)]**

Fischer, D., Bieber, T., Li, Y., Elsässer, H. P., Kissel, T. „A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity" *Pharm Res.* 1999 Aug;16(8):1273-9.

**[Fischer et al. (2003)]**

Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., Kissel, T. (2003) "In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis" *Biomaterials.* 2003 Mar; 24(7):1121-31.

**[Fischer et al (2005)]**

Fischer, D., Bhattacharya, R., Osburg, B., Bickel, U. „Inhibition of monocyte adhesion on brain-derived endothelial cells by NF-kappaB decoy/polyethylenimine complexes" *J Gene Med.* 2005 Aug;7(8):1063-76.

**[Folkman (1995)]**

Folkman, J. "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease" *Nature Medicine* 1, 27-30 (1 January 1995) | doi:10.1038/nm0195-27

**[Godbey et al. (1999)]**

Godbey, W. T., Wu, K. K., Mikos, A. G. "Size matters: Molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle" *J Biomed Mater Research* 45(3): 268-275, 1999

**[Godbey et al. (2000)]**

Godbey, W. T., Barry, M. A., Saggau, P., Wu, K. K., Mikos, A. G. (2000) "Poly(ethylenimine)-mediated transfection: A new paradigm for gene delivery." *J Biomed Mater Res* 51(3): 321-328, 2000

**[Godbey et al. (2001)]**

Godbey, W. T., Mikos, A. G. "Recent progress in gene delivery using non-viral transfer complexes." *Journal of Controlled Release* 72 (2001) 115-125

**[Goldfarb et al. (2011)]**

Goldfarb S. B., Hudis, C., Dickler, M. N. „Bevacizumab in metastatic breast cancer: when may it be used?" *Ther Adv Med Oncol.* 2011 Mar;3(2):85-93.

**[Gray et al. (2009)]**

Gray, R., Bhattacharya, S., Bowden, C., Miller, K., Comis, R. L. "Independent review of E2100: a phase III trial of bevacizumab plus paclitaxel versus paclitaxel in women with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2009 Oct 20;27(30):4966-72. Epub 2009 Aug 31.

**[Grayson et al. (2006)]**

Grayson, A. C., Doody, A. M., Putnam, D. "Biophysical and structural characterization of polyethylenimine-mediated siRNA delivery in vitro" *Pharm. Res.* 2006;23:1868–1876

**[Grzelinski et al. (2005)]**

Grzelinski, M., Bader, M., Czubyko, F., Aigner, A. (2005) "Ribozyme-targeting reveals the rate-limiting role of pleiotrophin in glioblastoma" *International Journal of Cancer*: 117, 942-951

**[Grzelinski et al. (2006)]**

Grzelinski, M., Urban-Klein, B., Martens, T., Lamszus, K., Bakowsky, U., Höbel, S., Czubyko, F., Aigner, A. "RNA interference-mediated gene silencing of pleiotrophin through polyethylenimine-complexed small interfering RNAs in vivo exerts antitumoral effects in glioblastoma xenografts" *Hum Gene Ther.* 2006 Jul;17(7):751-66.

**[Grosse et al. (2006)]**

Grosse, S., Thévenot, G., Monsigny, M., Fajac, I. „Which mechanism for nuclear import of plasmid DNA complexed with polyethylenimine derivatives?" *J Gene Med.* 2006 Jul;8(7):845-51

**[Günther et al. (2011)]**

Günther, M., Lipka, J., Malek, A., Gutsch, D., Kreyling, W., Aigner, A. "Polyethylenimines for RNAi-mediated gene targeting in vivo and siRNA delivery to the lung" *Eur J Pharm Biopharm.* 2011 Apr;77(3):438-49

**[Hammond et al. (2000)]**

Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, G., Hannon, G. J. (2000) "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells" *Nature*, Vol 404, 293-296

**[Hanahan et al. (1996)]**

Hanahan, D., Folkman, J. "Pattern and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis" *Cell* 1996; 86: 353–64.]

**[Hannon (2002)]**

Hannon, G. J. (2002) "RNA interference" *Nature*. 2002 Jul 11;418(6894):244-51

**[Hassani et al. (2005)]**

Hassani, Z., Lemkine, G. F., Erbacher, P., et al. (2005) "Lipid-mediated siRNA delivery down-regulates exogenous gene expression in the mouse brain at picomolar levels" *The Journal of Gene Medicine* 2005; 7: 198-207

**[Ho et al. (2007)]**

Ho, Q. T., Kuo, C. J. "Vascular endothelial growth factor: biology and therapeutic applications" *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(7-8):1349-57

**[Höbel et al. (2008)]**

Höbel, S., Prinz, R., Malek, A., Urban-Klein, B., Sitterberg, J., Bakowsky, U., Czubyko, F., Aigner, A. "Polyethylenimine PEI F25-LMW allows the long-term

storage of frozen complexes as fully active reagents in siRNA-mediated gene targeting and DNA delivery" *Eur J Pharm Biopharm.* 2008 Sep;70(1):29-41.

**[Höbel et al. (2010)]**

Höbel, S., Aigner, A. "Polyethylenimine (PEI)/siRNA-mediated gene knockdown in vitro and in vivo" *Methods Mol Biol.* 2010;623:283-97.

**[Honore et al. (2005)]**

Honoré, I., Grosse, S., Frison, N., Favatier, F., Monsigny, M., Fajac, I. "Transcription of plasmid DNA: influence of plasmid DNA/polyethylenimine complex formation" *J Control Release.* 2005 Oct 20;107(3):537-46

**[Imai et al. (1998)]**

Imai, S., Kaksonen, M., Raulo, E., Kinnunen, T., Fages, C., Meng, X., Lakso, M., Rauvala, H. "Osteoblast Recruitment and Bone Formation Enhanced by cell Matrix-associated Heparin-binding Growth-associated Molecule (HB-GAM). *J Cell Biol.* 143: 1113-1128 (1998)

**[Jäger et al. (2012)]**

Jäger, M., Schubert, S., Ochrimenko, S., Fischer, D., Schubert, U. S. "Branched and linear poly(ethylene imine)-based conjugates: synthetic modification, characterization, and application" *Chem Soc Rev.* 2012 Jul 7;41(13):4755-67

**[Jiang et al. (2008)]**

Jiang, H. L., Kim, T. H., Kim, Y. K., Park, I. Y., Cho, M. H., Cho, C. S. "Efficient gene delivery using chitosan-polyethylenimine hybrid systems" *Biomed Mater.* 2008 Jun;3(2):025013.

**[Kabanov et al. (1998)]**

Kabanov, V. A., Kabanov A. V. "Interpolyelectrolyte and block ionomer complexes for gene delivery: physico-chemical aspects" *Adv Drug Deliv Rev.* 1998 Mar 2;30(1-3):49-60.

**[Kajdaniuk et al. (2011)]**

Kajdaniuk, D., Marek, B., Forty, W., Kos-Kudła, B. "Vascular endothelial growth factor (VEGF) - part 1: in physiology and pathophysiology" *Endokrynol Pol.* 2011; 62(5):444-55.

**[Kamba et al. (2007)]**

Kamba T, McDonald DM. Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. *Br J Cancer.* 2007 Jun 18;96(12):1788-95

**[Kambhampati et al. (2005)]**

Kambhampati, S., Ray, G., Sengupta, K., Reddy, V. P., Banerjee, S. K., Van Veldhuizen, P. J. "Growth factors involved in prostate carcinogenesis" *Front Biosci.* 2005 May 1;10:1355-67

**[Kasper et al. (2011)]**

Kasper, J. C., Friess, W. „The freezing step in lyophilization: physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals” Eur J Pharm Biopharm. 2011 Jun; 78(2):248-63

**[Kasper et al. (2013)]**

Kasper, J. C., Kuchler, S., Friess, W. “Lyophilization of synthetic gene carriers” Methods Mol Biol. 2013;948:133-47

**[Kichler et al. (2001)]**

Kichler, A., Leborgne, C., Coeytaux, E., Danos, O. „Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study” J Gene Med. 2001 Mar-Apr;3(2):135-44.

**[Kim et al. (2007)]**

Kim, K., Lee, Y. S. und Carthew, R. W. “Conversion of pre-RISC to holo-RISC by Ago2 during assembly of RNAi complexes” RNA 13, 22-9 (2007).

**[Kim et al. (1993)]**

Kim, K. J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H. S., Ferrara, N. “Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo” Nature. 1993 Apr 29;362(6423):841-4

**[Kircheis et al. (2001)]**

Kircheis, R., Wightman, L., Wagner, E. “Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines” Advanced Drug Delivery Reviews 53 (2001), 341-358

**[Klomp et al. (2002)]**

Klomp, H. J., Zernial, O., Flachmann, S., Wellstein, A. und Juhl, H. (2002) „Significance of the Expression of the growth factor pleiotrophin in pancreatic cancer patients” Clinical Cancer Research Vol 8, 823-827, March 2002

**[Kojima et al. (1995)]**

Kojima, S., Muramatsu, H., Amanuma, H., Muramatsu, T. “Midkine enhances fibrinolytic activity of bovine endothelial cells” J Biol Chem. 270: 9590-9596 (1995)

**[Kong et al. (2012)]**

Kong, Y., Bai, P. S., Nan, K. J., Sun, H., Chen, N. Z., Qi, X.G. “Pleiotrophin is a potential colorectal cancer prognostic factor that promotes VEGF expression and induces angiogenesis in colorectal cancer” Int J Colorectal Dis. 2012 Mar;27(3):287-98. doi: 10.1007/s00384-011-1344

**[Kunath et al. (2003)]**

Kunath, K., von Harpe, A., Fischer, D., Petersen, H., Bickel, U., Voigt, K., Kissel, T. „Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine” J Control Release. 2003 Apr 14;89(1):113-25.

**[Labat-Moleur et al. (1996)]**

Labat-Moleur, F., Steffan, A. M., Brisson, C., Perron, H., Feugeas, O., Furstenberger, P., Oberling, F., Brambilla, E., Behr, J. P. "An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines" *Gene Ther* 1996; 3: 1010-1017.

**[Lemkine et al. (2001)]**

Lemkine, G. F., Demeneix, B. A. "Polyethylenimines for in vivo gene delivery" *Curr Opin Mol Ther.* 2001 Apr;3(2):178-82.

**[Leung et al. (1989)]**

Leung D. W., Cachianes G., Kuang, W. J., Goeddel D. V., and Ferrara N. "Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen" *Science* (1989) 246 (4935), 1306 - 1309

**[Li et al. (1990)]**

Li, Y. S., Milner P. G., Chauhan A. K., Watson M. A., Hoffman R. M., Kodner C. M., Milbrandt J., Deuel T. F. "Cloning and expression of a developmentally regulated protein that induces mitogenic and neurite outgrowth activity". *Science*. 250: 1690-1694 (1990)

**[Li et al. (2004)]**

Li, J. Z., Wang, Q. Q., Yu, H., Shen, F. P., Li, D., Zheng, Y. "Gene transfer by novel non-viral vector polyethylenimine" *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2004 May;33(3):229-34.

**[Lima et al. (2011)]**

Lima, A. B., Macedo, L. T., Sasse, A. D. „Addition of bevacizumab to chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis" *PLoS One*. 2011;6(8):e22681

**[Lu et al. (2005)]**

Lu, K. V., Jong, K. A., Kim, G. Y., Singh, J., Dia, E. Q., Yoshimoto, K., Wang, M. Y., Cloughesy, T. F., Nelson, S. F., Mischel, P. S. "Differential induction of glioblastoma migration and growth by two forms of pleiotrophin" *J Biol Chem* 2005, 280:26953-26964

**[Lungwitz et al. (2005)]**

Lungwitz, U., Breuning, M., Blunk, T., Göpferich, A. (2005) "Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems" *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69(2): 247-266

**[Maeda et al. (1996)]**

Maeda, N., Nishiwaki, T., Shintani, T., Hamanaka, H., Noda, M. "6B4 proteoglycan/phosphacan, an extracellular variant of receptor-like protein-tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta, binds pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM)" *J Biol Chem* 1996, 271:21446-21452



**[Martinez et al. (2002)]**

Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R. & Tuschl, T. "Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi" *Cell* 110, 563-74 (2002)

**[Mikelis et al. (2011)]**

Mikelis, C., Lamprou, M., Koutsoumpa, M., Koutsoubas, A. G., Spyrali, Z., Zompra, A. A., Spiliopoulos, N., Vradis, A. A., Katsoris, P., Spyroulias, G. A., Cordopatis, P., Courty, J., Papadimitriou, E. (2011) "A peptide corresponding to the C-terminal region of pleiotrophin inhibits angiogenesis in vivo and in vitro" *J Cell Biochem.* 2011 Jun; 112(6):1532-43

**[Moghimi et al. (2005)]**

Moghimi, S. M., Symonds, P., Murray, J. C., Hunter, A. C., Debska, G., Szewczyk, A. (2005) "A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy" *Mol Ther.* 2005 Jun;11(6):990-5

**[Molina et al. (2001)]**

Molina, M. C., Allison, S. D., Anchordoquy, T. J. "Maintenance of nonviral vector particle size during the freezing step of the lyophilization process is insufficient for preservation of activity: insight from other structural indicators" *J Pharm Sci.* 2001 Oct;90(10):1445-55

**[Nakagawara et al. (1995)]**

Nakagawara, A., Milbrandt, J., Muramatsu, T., Deuel, T. F., Zhao, H., Cnaan, A., Brodeur, G. M. "Differential expression of pleiotrophin and midkine in advanced Neuroblastomas" *Cancer Res.* 55: 1792-1797 (1995)

**[Neu et al. (2005)]**

Neu, M., Fischer, D., Kissel, Th. (2005) "Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethyleneimine) and its derivatives" *The Journal of Gene Medicine* 7: 992-1009

**[Nimesh (2012)]**

Nimesh, S. "Polyethylenimine as a promising vector for targeted siRNA delivery" *Curr Clin Pharmacol.* 2012 May;7(2):121-30

**[Nyberg et al. (2005)]**

Nyberg P., Xie, L. and Kalluri, R. "Endogenous Inhibitors of Angiogenesis" *Cancer Research* 65, 3967-3979, May 15, 2005

**[Nykänen et al. (2001)]**

Nykänen A., Haley B., Zamore P. D. "ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway." *Cell.* 2001 Nov 2;107(3):309-21

**[O'Brien et al. (1994)]**

O'Brien, E. R., Garvin, M. R., Dev, R., et al. "Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques" *Am J Pathol* 1994; 145: 883–894

**[Oh et al. (2002)]**

Oh, Y. K., Suh, D., Kim, J. M., Choi, H. G., Shin, K., Ko, J. J. "Polyethylenimine-mediated cellular uptake, nucleus trafficking and expression of cytokine plasmid DNA" *Gene Ther.* 2002 Dec;9(23):1627-32

**[Ogris et al. (1998)]**

Ogris, M., Steinlein, P., Kursa, M., Mechtler, K., Kircheis, R., and Wagner, E. (1998) "The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells" *Gene Ther* 5, 1425-1433

**[Papadimitriou et al. (2009)]**

Papadimitriou, E., Mikelis, C., Lampropoulou, E., Koutsoumpa, M., Theochari, K., Tsirmoula, S., Theodoropoulou, C., Lamprou, M., Sfaelou, E., Vourtsis, D., Boudouris, P. "Roles of pleiotrophin in tumor growth and angiogenesis" *Eur Cytokine Netw.* 2009 Dec;20(4):180-90

**[Perez-Pinera et al. (2007)]**

Perez-Pinera, P., Chang, Y., Deuel, T. F. "Pleiotrophin, a multifunctional tumor promoter through induction of tumor angiogenesis, remodeling of the tumor microenvironment, and activation of stromal fibroblasts" *Cell Cycle.* 2007 Dec 1;6(23):2877-83

**[Perez-Pinera et al. (2008)]**

Perez-Pinera, P., Berenson, J. R., Deuel, T. F. "Pleiotrophin, a multifunctional angiogenic factor: mechanisms and pathways in normal and pathological angiogenesis" *Curr Opin Hematol.* 2008 May;15(3):210-4

**[Pollard et al. (1998)]**

Pollard, H., Remy, J. S., Loussouarn, G., Demolombe, S., Behr, J. P., Escande, D. "Poly-ethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells" *J Biol Chem.* 1998 Mar 27;273(13):7507-11

**[Rak et al. (1995)]**

Rak JW, St. Croix BD, Kerbel RS. "Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis, and cancer therapy" *Anticancer Drugs* 1995; 6: 3–18

**[Raulo et al. (1994)]**

Raulo, E., Chernousov, M. A., Carey, D. J., Nolo, R., Rauvala, H. "Isolation of a neuronal cell surface receptor of heparin binding growth-associated molecule (HB-GAM). Identification as N-syndecan (syndecan-3)" *J Biol Chem* 1994, 269:12999-13004

**[Rauvala et al. (1987)]**

Rauvala, H., Pihlaskari, R. (1987) "Isolation and some characteristics of an adhesive factor of brain that enhances neurite outgrowth in central neurons" *J. Biol. Chem.* 262 (34):16625–35

**[Read et al. (2005)]**

Read, M. L., Singh, S., Ahmed, Z., et al. "A versatile reducible polycation-based system for efficient delivery of a broad range of nucleic acids" *Nucleic Acids Research*, 2005, Vol. 33, No. 9

**[Remy et al. (1998)]**

Remy, J. S., Abdallah, B., Zanta M. A., et al. "Gene transfer with lipospermines and polyethylenimines" *Advanced Drug Delivery Reviews* 30 (1998) 85-95

**[Ribatti et al. (2008)]**

Ribatti, D., Vacca, A. „The role of microenvironment in tumor angiogenesis" *Genes Nutr.* 2008 Apr; 3(1):29-34

**[RKI (2010)]**

Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes „Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland, Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010" Eine Veröffentlichung des Zentrums für Krebsregisterdaten am RKI, Robert Koch-Institut, Berlin 2010, Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek (Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie)

**[Robert et al. (2011)]**

Robert, N. J., Diéras, V., Glaspy, J., Brufsky, A. M., Bondarenko, I., Lipatov, O. N., Perez, E. A., Yardley, D. A., Chan, S. Y., Zhou, X., Phan, S. C., O'Shaughnessy, J. "RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer" *J Clin Oncol.* 2011 Apr 1;29(10):1252-60

**[Rols (2008)]**

Rols, M. P. "Mechanism by which electroporation mediates DNA migration and entry into cells and targeted tissues" *Methods Mol Biol.* 2008;423:19-33

**[Roy et al. (2006)]**

Roy, H., Bhardwaj, S., Ylä-Herttuala, S. "Biology of vascular endothelial growth factors" *FEBS Letters* 580 (2006) 2879-2887

**[Seisenberger et al. (2001)]**

Seisenberger, G., Ried, M. U., Endress, T., Buning, H., Hallek, M. and Brauchle, C. (2001) "Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus" *Science* 294(5548): 1929-32

**[Schröder et al. (2009)]**

Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ et al. (2009) Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med.* 2009 Mar 26; 360(13): 1320–8

**[Schulte et al. (1997)]**

Schulte, A., and Wellstein, A. (1997) "Pleiotrophin and related molecules" Bicknell, R., Lewis, C. M. and Ferrara, N. (eds.), *Tumor angiogenesis*, pp. 273-289. New York: Oxford University Press

**[Senger (2010)]**

Senger, D. R. "Retrospective: Vascular Endothelial Growth Factor: Much More than an Angiogenesis Factor" *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 21, 377–379, February 1, 2010

**[Singha et al. (2011)]**

Singha, K., Namgung, R., Kim, W. J. "Polymers in Small-Interfering RNA Delivery" *Nucleic Acid Ther.* 2011 June; 21(3): 133–147

**[Souttou et al. (1998)]**

Souttou, B., Juhl, H., Hackenbruck, J., Röckseisen, M., Klomp, H. J., Raulais, D., Vigny, M., Wellstein, A. "Relationship between serum concentrations of the growth factor pleiotrophin and pleiotrophin-positive tumors" *J Natl Cancer Inst.* 1998 Oct 7;90(19):1468-73.

**[Stoica et al. (2001)]**

Stoica, G. E., Kuo, A., Aigner, A., Sunitha, I., Souttou, B., Malerczyk, C., Caughey, D. J., Wen, D., Karavanov, A., Riegel, A. T., Wellstein, A. "Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin" *J Biol Chem* 2001, 276:16772-16779

**[Suh et al. (1994)]**

Suh, J., Paik, H. J., Hwang, B. K. "Ionization of Poly(ethylenimine) and Poly(allylamine) at various pH's" *Bioorg. Chem.* 22 (1994) 318-327

**[Talsma et al. (1997)]**

Talsma, H., Cherng, J., Lehrmann, H., Kursa, M., Ogris, M., Hennink, W. E., Cotten, M., Wagner, E. „Stabilization of gene delivery systems by freeze-drying" *Int J Pharm.* 1997 Nov 28;157(2):233-238

**[Tang and Szoka (1997)]**

Tang, M. X., Szoka, F. C. "The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes" *Gene Ther.* 1997 Aug;4(8):823-32

**[Tol et al. (2010)]**

Tol, J., Punt, C. J. "Monoclonal antibodies in the treatment of metastatic colorectal cancer: a review" *Clin Ther.* 2010 Mar;32(3):437-53

**[Urban-Klein et al. (2005)]**

Urban-Klein, B., Werth, S., Czubayko, F., Aigner, A. (2005) "RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo." *Gene Therapy* 12(5): 461-466

**[Vandoorne et al. (2010)]**

Vandoorne, K., Addadi, Y., Neeman, M. "Visualizing vascular permeability and lymphatic drainage using labeled serum albumin" *Angiogenesis.* 2010 Jun;13(2):75-85

**[Weber et al. (2000)]**

Weber D., Klomp H.J., Czubayko F., Wellstein A., Juhl H.: Pleiotrophin can be rate-limiting for pancreatic cancer cell growth. *Cancer Res.* 60: 5284-5288 (2000)

**[Weckbach et al. (2011)]**

Weckbach, L. T., Muramatsu, T., Walzog, B. "Midkine in inflammation" Scientific World Journal. 2011;11:2491-505

**[Werth et al. (2006)]**

Werth, S., Urban- Klein, B., Dai, L., Höbel, S., et al. (2006) "A low molecular weight fraction of polyethylenimine (PEI) displays increased transfection efficiency of DNA and siRNA in fresh or lyophilized complexes" Journal of Controlled Release Vol. 112, Issue 2 (2006) 257-270

**[Wightman et al. (2001)]**

Wightman, L., Kircheis, R., Rössler, V., et al. „Different behaviour of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo" Journal of Gene Medicine. 2001;3(4):362–372

**[Yamazaki et al. (2003)]**

Yamazaki, Y., Takani, K., Atoda, H., Morita, T. "Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2)" J Biol Chem 278 (2003), pp. 51985–51988

**[Zamore et al. (2000)]**

Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., Bartel D. P. "RNAi: Double-Stranded RNA Directs the ATP-Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals" Cell, Vol. 101, 25-33, March 31, 2000

**[Zaric et al. (2004)]**

Zaric, V., Weltin, D., Erbacher, P. Behr, J.-P., Stephan, D. (2004) "Effective polyethylenimine-mediated gene transfer into human endothelial cells" The Journal of Gene Medicine 2004; 6: 176-184

**[Zelphati et al. (1998)]**

Zelphati, O., Nguyen, C., Ferrari, M., Felgner, J., Tsai, Y., Felgner, P. L. „Stable and monodisperse lipoplex formulations for gene delivery." Gene Ther. 1998 Sep; 5(9):1272-82

**[Zhang et al. (1999)]**

Zhang, N., Deuel, T. F. (1999) „Pleiotrophin and midkine, a family of mitogenic and angiogenic heparin-binding growth and differentiation factors" Curr Opin Hematol 6(1) 1999, 44-50

**[Zhang et al. (2006)]**

Zhang, N., Zhong, R., Perez-Pinera, P., Herradon, G., Ezquerra, L., Wang, Z. Y., Deuel, T. F. "Identification of the angiogenesis signaling domain in pleiotrophin defines a mechanism of the angiogenic switch" Biochem Biophys Res Commun. 2006 May 5;343(2):653-8

## 9 Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. A. Aigner für das Thema meiner Doktorarbeit und für seine hervorragende Betreuung bedanken. Er hat diese Arbeit mit seinen Ideen und seiner Erfahrung geduldig betreut. In vielen anregenden Diskussionen wurde die Arbeit immer wieder vorangetrieben und Prof. Dr. A. Aigner war stets Ansprechpartner bei allen Schwierigkeiten.

Mein großer Dank gilt Prof. Dr. F. Czubayko für das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit an seinem Institut.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Julia Hagenbusch, Marius Grzelinski, Denise Hager und Andrea Wüstenhagen, mit denen die Arbeit im Labor Spaß machte und die immer tatkräftig zur Seite standen.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich stets unterstützen und mir mein Studium ermöglicht haben. Vielen Dank für die stetigen Aufmunterungen und Ermahnungen. Besonders Danken möchte ich auch meiner Schwester und meinem Freund Matthias Senf, die beide immer ein offenes Ohr für mich hatten.

## 10 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten an der Philipps-Universität Marburg

Aigner	Koolmann	Seitz
Arnold	Krieg	Steiniger
Aumüller	Kroll	Strepel
Barth	Kühnert	Vogelmeier
Basler	Kuhlmann	Wagner
Baum	Lang	Weihe
Becker	Lill	Weiler
Behr	Lippert	Werner
Berger	Löffler	Westermann
Bertalanffy	Lohoff	Wulf
Bien	Maier	Zielk
Boekhoff	Maisch	
Christiansen	Moll	
Czubayko	Moosdorf	
Daut	Müller	
Dünne	Mutters	
Eilers	Neubauer	
Feuser	Nimsky	
Folz	Oertel	
Gerdes	Radsak	
Gotzen	Remschmidt	
Grzeschik	Renz	
Gudermann	Richter	
Hasilik	Röhm	
Hertl	Rothmund	
Hofmann	Schäfer	
Jungclas	Schmidt	
Klenk	Schrader	
Klose	Seifart	

und an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Brüwer

Diller

Domschke

Mesters

Senninger

Steinhoff



